تاثیر سیلیکون بر تحمل به خشکی در گندم

سارا طالع احمد[۱*] و رحیم حداد[۲]

چکیده

اثر سیلیکون بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدان کاتالاز (CAT)، سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POD) در شرایط تنش خشکی در گندم (*Triticum aestivum* L.) در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال ۳ تیمار شاهد، خشکی و سیلیکون- خشکی (۱ میلی مولار سیلیکات سدیم در هر کیلوگرم خاک) در ۳ تکرار صورت گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که در مقایسه با گیاهانی که تنها تحت تیمار خشکی بوده‌اند، تیمار سیلیکون باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده CAT، SOD، APX و POD و همچنین افزایش در محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین محلول در برگ‌هایی که تحت تنش خشکی قرار گرفته‌اند گردید. تیمار خشکی باعث اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم CAT نشد. بین آنزیم‌های مورد بررسی در تیمار سیلیکون، آنزیم پراکسیداز دارای بیشترین فعالیت بود. افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و بررسی الگوی باندی آیزوزایم‌های این آنزیم‌ها روی ژل اکریل آمید نشان داد که ظهور باندهای آیزوزایمی جدید مرتبط با تیمار سیلیکون بود. به علاوه سیلیکون باعث محافظت از بافت‌های گیاهی در مقابل حملات اکسیدکننده ناشی از تنش خشکی شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می رسد که سیلیکون احتمالاً در تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی جهت افزایش مقاومت به خشکی در گیاهان نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، تحمل به خشکی، آنزیم های ضد اکسنده، سیلیکون

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

۲. عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

*: نویسنده مسوول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنش‌های محیطی مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی در سطح جهان هستند. تنش خشکی علت اصلی کاهش رشد گیاهان و عملکرد آن‌ها در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شود که موجب تحریک گیاه به یک‌سری پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی، فیزیولوژیکی و رشدی می‌گردد (شارما و دبی، ۲۰۰۵). کمبود آب در گیاه اغلب باعث افزایش مقادیر انواع اکسیژن فعال ROS[1] می‌شود. گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی برای دفاع در مقابل ROS استفاده می‌کنند (آل‌آقاباری و همکاران، ۲۰۰۴). سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌های ضد اکسنده مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، اسکوربیت پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بوده و سیستم غیر آنزیمی در برگیرنده ترکیباتی از قبیل اسید آسکوربیک، کارتنوئیدها، گلوتاتیون و توکوفرول می باشد.

سیلیکون جزء یکی از عناصر فراوان موجود در خاک است، به دلیل این‌که در دسته عناصر ضروری برای رشد گیاهان قرار نگرفته توجه زیادی به نقش بیولوژیکی آن در گیاه نشده است. اخیراً در پژوهش‌های صورت گرفته به اثرات مفید و حاصل‌خیزی آن در چندین گونه گیاهی اشاره شده است، به‌ویژه در زمان بروز تنش‌های محیطی، با افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و بالا بردن محتوای اسمولیت‌ها نقش مهمی را در ایجاد مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان ایفا می‌کند. این ماده هم‌چنین با کاهش در نرخ کاربرد علف کش‌ها و مواد سمی مانع از آلودگی محیط زیست از اثرات مضر ناشی از استعمال سموم کشاورزی می‌شود (اپستین، ۱۹۹۹). علی‌رغم فراوان بودن این ماده در سطح کره زمین به‌دلیل همراه بودن آن با سایر عناصر از دسترس گیاه خارج است. بنابراین می‌توان با افزودن کودهای سیلیکون که حاوی فرم قابل دسترس آن $Si_2(OH)_4$ می‌باشد، گیاه را در برابر تنش‌های محیطی مقاوم نمود (اپستین، ۱۹۹۴). آل‌آقاباری و همکاران (۲۰۰۴) اثرات سیلیکون را بر روی مقاومت به شوری در گوجه فرنگی بررسی کردند. این آزمایش شامل سه تیمار (۲/۵ میلی‌مولار Si، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl و ۲/۵ میلی‌مولار Si +۹۷/۵ میلی‌مولار NaCl) بود. نتایج آزمایش نشان داد که سیلیکون به‌طور ویژه‌ای باعث کاهش اثرات منفی نمک و ایجاد مقاومت در گوجه‌فرنگی گردید. طی آزمایشی گانگ و همکاران (۲۰۰۵) اثرات سیلیکون را بر روی گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار دادند. طی این بررسی مشخص شد که در مقایسه با تیمار خشکی کاربرد Si باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده (SOD، CAT و GR) گردید. در اثر تنش خشکی میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) افزایش یافت، در حالی‌که اعمال Si منجر به کاهش میزان (H_2O_2)، فعالیت اسید فسفولیپاز (AP) و خسارات ناشی از تنش اکسید کننده گردید. موسی (۲۰۰۶) طی آزمایشی اثرات سیلیکون خارجی را در گیاه ذرت تحت تنش شوری مورد بررسی قرار داد. او گزارش کرد که تحت تنش شوری محتوای کلروفیل گیاه به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد در صورتی‌که حضور Si در محیط کشت باعث افزایش در محتوای کلروفیل a و b در مقایسه با تنش شوری می‌شود. لی و همکاران (۲۰۰۷) اثرات سیلیکون را بر روی میزان مقاومت به خشکی گیاه ذرت تحت شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایش نشان داد که تحت شرایط تنش ملایم و شدید اعمال سیلیکون به‌ترتیب باعث افزایش عملکرد به میزان۳۳٪-۳۱/۱٪ و ۴۰٪-۲۳/۷٪ می‌شود. در تیمار سیلیکون محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده POD، SOD و CAT در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش یافت. هم‌چنین سیلیکون باعث افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی و نرخ فتوسنتزی گردید.

در بین غلات گندم اهمیت ویژه‌ای دارد به دلیل اینکه این گیاه زراعی یکی از محصولات غذایی عمده دنیای امروزی به شمار می‌رود. با توجه به نیاز شدید مردم به این محصول و نیز با در نظر گرفتن اینکه کشور ما دارای آب و هوای خشک و نیمه خشک است و بخش اعظمی از این سرزمین دارای محدودیت زراعی از جمله آب می‌باشد، نیاز اقدام به تولید و عرضه محصولاتی با

1. Reactive oxygen species

Archive of SID
www.SID.ir

عملکرد بالاتر و قابلیت تحمل بیشتر به شرایط تنش بیش از پیش احساس می‌شود. این آزمایش با هدف بررسی اثرات سیلیکون بر میزان فعالیت آنزیم های ضداکسنده و محتوای پروتئین محلول در شرایط تنش خشکی در گندم به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثرات سیلیکون در افزیش مقاومت به خشکی، رقم گندم نان (وری‌ناک) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با سه تیمار شاهد (آبیاری کامل)، سیلیکون-خشکی (یک مگاپاسکال) و تنش خشکی (یک مگاپاسکال) مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار سیلیکون با افزودن سیلیکات سدیم (یک میلی مولار در هر کیلوگرم خاک) قبل از کاشت صورت گرفت. این آزمایش در گلخانه با شرایط متوسط دمای حداقل و حداکثر به‌ترتیب ۱۷ و ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت ۲۲ تا ۳۱ درصد انجام گرفت. خاک مورد استفاده ترکیبی از ماسه، خاک زراعی و مواد آلی به نسبت ۱: ۱: ۱ بود. برای ارزیابی رطوبت خاک گلدان‌ها و اعمال تیمار خشکی از بلوک گچی[1] استفاده گردید. نمونه برداری در مرحله ۴ برگی صورت گرفت.

میزان نسبی آب برگ[2] با استفاده از وزن تر برگ (FW[3])، وزن خشک (DW[4]) و وزن تورژسانس برگ (TW[5]) اندازه‌گیری شد (تورنر، ۱۹۸۱). جهت استخراج پروتئین محلول کل از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) استفاده شد. میزان پروتئین محلول کل طبق روش بردفورد (۱۹۷۹) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی[6] استفاده گردید. میزان کلروفیل بر اساس روش آرنون (۱۹۴۹) محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده به روش اسپکتروفتومتری[7] اندازه‌گیری شد. به‌منظور محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز (۶. ۱. ۱۱. ۱ CAT, EC) از روش ابی (۱۹۸۴) و به‌وسیله نمایش میزان تغییرات ایجاد شده در جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در نتیجه تجزیه پراکسید هیدروژن استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم به‌صورت Δ_{240} /mgPro/min بیان گردید. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱۰۱۱۰۱۰۱۱ APX, EC) طبق روش ناکانو و اسادا (۱۹۸۷) و بر اساس میزان اکسیداسیون اسید آسکوربیت از طریق دنبال کردن کاهش در جذب، در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت سه دقیقه تخمین زده شد و میزان فعالیت آنزیم به‌صورت Δ_{290} /mgPro/min بیان گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز (۷. ۱. ۱۱. ۱ POX, EC) به روش چانس و مهلی (۱۹۵۵) اندازه‌گیری شد که این آنزیم با استفاده از ترکیبات فنولی گوئیکول پراکسید هیدروژن را به آب احیاء می‌کند. در اثر این عمل، گوئیکول به تتراگوئیکول تبدیل می‌شود که حداکثر جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر صورت می‌گیرد. فعالیت آنزیم در اثر افزایش در میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر، به‌صورت Δ_{470}/mgPro/min تخمین زده شد. فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (۱۰۱۵۰۱۰۱ SOD, EC) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به فورمازون به‌روش بیوشامپ و فریدوویچ (۱۹۷۱) تعیین گردید که میزان بیان فعالیت آنزیم به‌صورت Unit/mg Pro بود. جهت آشکارسازی تغییرات مقدار پروتئین کل در طول دوره آزمایش از روش الکتروفورز پروتئین کل (SDS-PAGE) طبق روش لاملی (۱۹۷۰) از ژل جداکننده ۱۲/۵٪ و ژل متراکم کننده ۴/۵٪ استفاده گردید. الکتروفورز در دمای اتاق با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. به‌منظور مشاهده باندهای پروتئینی از رنگ آمیزی کوماسی‌بلو بر اساس روش ریبیکی و پیروس (۲۰۰۳) و برای جداسازی و الکتروفورز آنزیم‌های ضد اکسنده از روش الکتروفورز بومی ژل (Native-PAGE) طبق روش لاملی (۱۹۷۰) استفاده شد. به‌منظور الکتروفورز بومی آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از ژل جداکننده ۶٪ و ژل متراکم کننده ۴٪ استفاده گردید، رنگ آمیزی اختصاصی آنزیم کاتالاز بر اساس روش روبرتسون و همکاران (۱۹۸۷) و آنزیم پراکسیداز

1. Gypsum Block. (Eijkelkamp 14. Model 22)
2. Relative Water Content = (FW-DW)/(TW-DW)×100
3. Fresh weight
4. Drought weight
5. Turgescence weight
6. Bovin serum albumin (BSA)
7. UV-3200, Labomed USA

Archive of SID

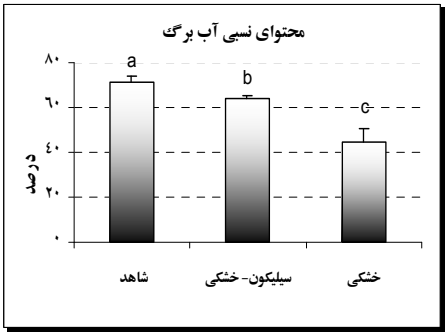
www.SID.ir

بر اساس روش هارت و همکاران (۱۹۷۱) انجام شد. برای الکتروفورز بومی آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز از ژل جداکننده ۱۰٪ و ژل متراکم کننده ۴٪ استفاده گردید. رنگ‌آمیزی اختصاصی آنزیم سوپراکساید دیسموتاز طبق روش بیوشامپ و فریدوویچ (۱۹۷۱) و رنگ‌آمیزی اختصاصی آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش رائو و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. برای الکتروفورز آنزیم‌های فوق از دمای $4^{\circ}C$ و ۲۵ میلی‌آمپر استفاده گردید.

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11.5 و MSTATC انجام شد. نمودار ها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در اثر تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، در حالی‌که اعمال سیلیکون مانع از کاهش RWC در مقایسه با تیمار خشکی می‌گردد (شکل ۱). یکی از دلایل افزایش در محتوای RWC در اثر اعمال سیلیکون در شرایط تنش خشکی افزایش استحکام بافت برگی می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که در بافت‌های گیاهی سیلیکون به فرم سیلیکا ($SiO_2.nH_2O$) در آپوپلاست دیواره سلولی رسوب کرده و باعث استحکام بافت می‌گردد (سنگ و همکاران، ۲۰۰۲). زمانی‌که دیواره سلولی سخت‌تر می‌شود در اثر دهیدراسیون برگ، کاهش بیشتری در پتانسیل آب اتفاق می‌افتد (جانسون و همکاران، ۱۹۸۴). پس در محتوای نسبی آب مورد نظر شیب پتانسیل آبی از برگ تا خاک در تیمار سیلیکون در مقایسه با تیمار شاهد تندتر است. در نتیجه در این حالت گیاه برای گسترش شیب مورد نیاز جهت تامین آب از خاک خشک، به تعرق کمتری نیاز دارد. بنابراین این ماده با کاهش هدر رفت آب و افزایش راندمان فتوسنتزی باعث افزایش وزن خشک و در نتیجه افزایش عملکرد می‌گردد.

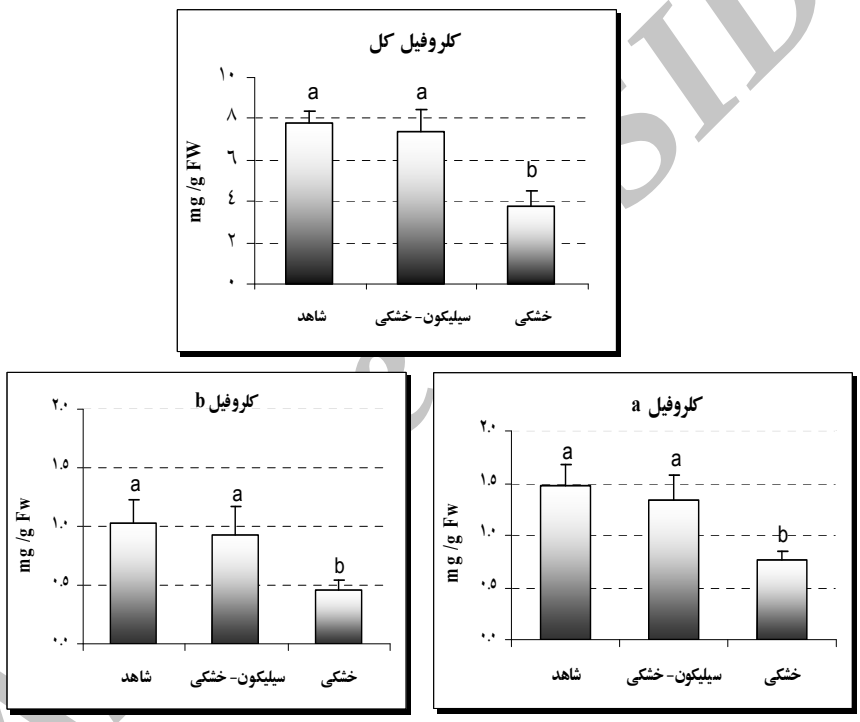


شکل ۱: تغییرات محتوای نسبی آب برگ بر اساس تیمارهای شاهد، سیلیکون- خشکی و خشکی

همان‌گونه که در نمودار ۲ دیده می‌شود در اثر تیمار خشکی محتوای کلروفیل a و b در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱)، در صورتی‌که حضور سیلیکون در محیط کشت مانع از کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش گردید. در شرایط تنش اکسنده و تنش‌های محیطی مانند خشکی میزان تولید رادیکال‌های فعال و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی افزایش می‌یابد (گانگ و همکاران، ۲۰۰۵). مشخص شده است که تخریب کلروفیل نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تشکیل هیدروپراکسید اسیدهای چرب موجود در غشاء می‌باشد (گانگ و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین قسمتی از کاهش کلروفیل در زمان تنش اکسنده می‌تواند نتیجه پراکسیداسیون غشاهای کلروپلاستی باشد. اعمال سیلیکون باعث افزایش در فعالیت‌های فتوسنتزی تحت شرایط خشکی می‌گردد که موازی با افزایش در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزیک ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز و گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز می‌باشد. سیلیکون با قرار گرفتن در آپوپلاسم دیواره‌های خارجی سلول‌های اپیدرمی، علاوه بر استحکام برگ باعث تولید بافت ناهمواری در دو سطح برگ می‌شود که این امر باعث به تاخیر انداختن مرگ برگی در نتیجه افزایش در محتوای کلروفیل و کاهش در میزان تعرق روزنه‌ای می‌گردد. افزایش در محتوای کلروفیل در این بررسی با پژوهش‌های صورت گرفته در گیاه گندم (گانگ و همکاران، ۲۰۰۵) و ذرت تحت تنش خشکی (یانگ و همکاران، ۲۰۰۷) و جو در شرایط غلظت بالای NaCl (لیانگ و همکاران، ۲۰۰۳) مطابقت دارد. طی این

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی در اثر تنش خشکی میزان کلروفیل a و b در مقایسه با شاهد به‌ترتیب به میزان ۴۷/۰۱٪ و ۵۵/۳۰٪ کاهش یافت. با توجه به داده‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که میزان خسارت وارده به کلروفیل b تحت تنش خشکی بیشتر بوده است. اونسل و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که مقدار زیادی از کلروفیل b موجود در کلروپلاست در کمپلکس‌های برداشت کننده نور در فتوسیستم II قرار دارد. این پژوهش‌گران بیان می‌دارند که در شرایط تنش، کمپلکس‌های برداشت کننده نور بیشتر آسیب می‌بینند که باعث کاهش شدید کلروفیل b در کلروپلاست و افزایش نسبت a به b تحت تنش خواهد بود. کاهش در میزان کلروفیل a و b در تیمار سیلیکون- خشکی در مقایسه با شاهد به‌ترتیب معادل ۹/۲۳٪ و ۱۰/۱۴٪ بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان‌داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و سیلیکون از نظر میزان کلروفیل a و b وجود ندارد (شکل ۲) و هر دو تیمار در یک گروه آماری قرار دارند (جدول ۲). از جمله دلایل افزایش میزان کلروفیل b در تیمار سیلیکون می‌توان به تاثیر سیلیکون در افزایش کارایی فتوسیستم II اشاره کرد که توسط آل آقاباری و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه گوجه فرنگی که تحت تنش شوری قرار گرفته بود گزارش شده است.



شکل ۲: تغییرات کلروفیل کل، a وb تحت تاثیر تیمارهای شاهد، سیلیکون- خشکی و خشکی

جدول ۱: میانگین مربعات تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ، پروتئین، کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده کاتالاز (CAT)، سوپراکساید دیسموتاز (SOD)،آسکوربیت پراکسیداز (APX)و پراکسیداز (POD)

منبع تغییرات	درجه آزادی	RWC	کلروفیل			پروتئین	آنزیم			
			a	b	کل	محلول کل	CAT	SOD	APX	POD
تیمار	۲	۱۲۲۷/۱**	۰/۸۶۷**	۰/۵۴۷**	۲۹/۷۸*	۳۰۱**	۱/۱۷*	۶۸/۷۳**	۰/۵۴۷**	۸/۵**
خطا	۱۵	۴/۸۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۵۶۹	۰/۹۹۶	۰/۰۰۰۳	۵/۵۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲
%CV		۸	۵/۸	۶/۷	۱۲	۳/۰۲	۳/۳	۹/۸	۵/۶	۹

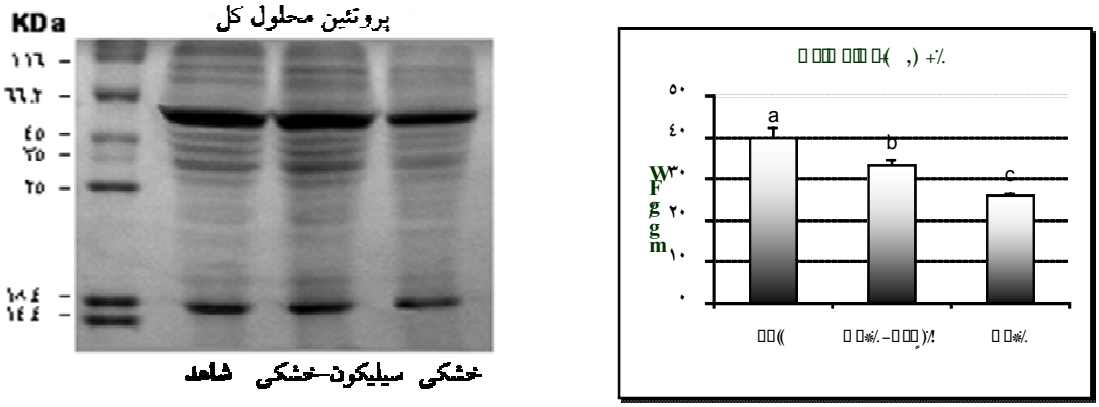
**: معنی‌دار در سطح ۱٪ ، *: معنی‌دار در سطح ۵٪

www.SID.ir

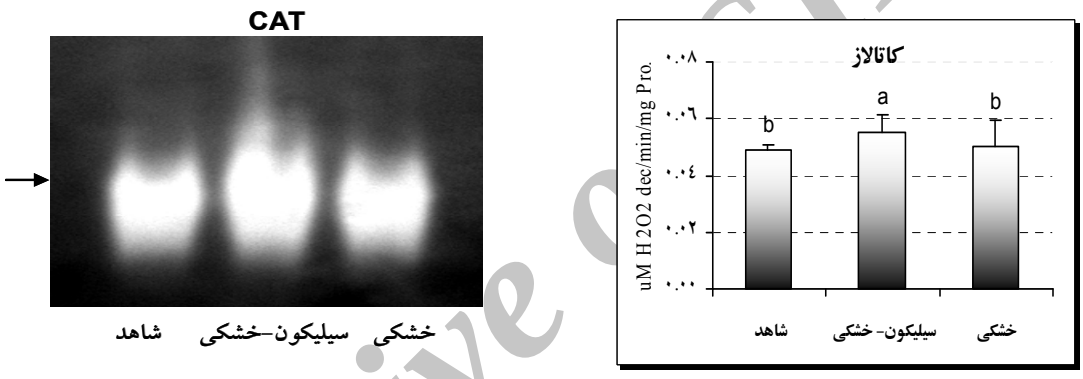
تنش خشکی به‌طور معنی‌داری باعث کاهش در محتوای پروتئین محلول گردید. اعمال سیلیکون مانع از تجزیه پروتئین در شرایط تنش شده و این روند کاهشی را کمتر می‌کند. نتایج به‌دست آمده از آشکارسازی ژل ، داده‌های حاصل از سنجش اسپکتروفتومتری را تائید می‌کند (شکل ۳). روبیسکو آنزیم موثر در فتوسنتز است که ۵۰ درصد پروتئین برگ را تشکیل می‌دهد. بنابراین تغییر در پروتئین‌های محلول برگ با تغییر در محتوای این آنزیم همراه است (اوستن و همکاران، ۱۹۹۵). به‌نظر می‌رسد که کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی با کاهش سنتز آن (رنجان و همکاران، ۲۰۰۱)، افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین و نیز تجمع اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین مرتبط است. گانگ و همکاران (۲۰۰۵) طی آزمایشی دریافتند که میزان گروه‌های کربونیل که در اثر اکسیده شدن پروتئین تولید می‌گردند تحت تنش خشکی در گیاه افزایش یافته، در صورتی‌که افزودن سیلیکون خارجی به محیط کشت باعث کاهش در محتوای گروه‌های کربونیل گردیده که نشان دهنده کاهش خسارات اکسیداتیو به پروتئین می‌باشد.

در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده SOD، APXو POD در اثر تنش خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (شکل‌های ۵، ۶ و ۷). در حالی‌که تحت این شرایط تغییری در میزان فعالیت آنزیم CAT مشاهده نگردید و همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد و خشکی فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱) ولذا هر دو تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲). نتایج مشابه توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است. گانگ و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که در نمونه‌های برگی گندم، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده APX، POD و GR در شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد. بر اساس گزارش بای و سوئی (۲۰۰۶) در گیاه ذرت تحت شرایط تنش کم آبی تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده نگردید. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که فعالیت آنزیم CAT در تیمار سیلیکون در مقایسه با تیمار شاهد و خشکی به‌ترتیب به میزان ۱۲/۱۲٪ و ۱۰/۵۵٪ افزایش یافت (شکل ۴). این آنزیم قادر است بدون نیاز به عامل احیاء کننده H_2O_2 موجود در سلول را به H_2O و O_2 تبدیل کند (تورکان و همکاران، ۲۰۰۵). حدود ۹۰ درصد از ماده خشک گیاهی از تثبیت CO_2 به‌وسیله آنزیم روبیسکو حاصل می‌شود. این آنزیم قادر است با اکسیژن نیز واکنش داده و در عوض فسفوگلیسرات، فسفوگلیکولات تولید کند که در نهایت به آزاد شدن CO_2 می‌انجامد. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اضافی در دمای بالا از طریق دکربوکسیلاسیون فسفوگلیکولات به آزاد شدن CO_2 و تسریع تنفس نوری کمک می‌کند، از آنجائی‌که تنفس نوری با تولید CO_2 و مصرف ATP همراه است باعث هدر رفتن انرژی سلول می‌شود. کاتالاز سبب زدودن H_2O_2 از محیط می‌گردد، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم در تیمار سیلیکون به کاهش تنفس نوری و کاهش نقطه جبرانی CO_2 کمک می‌کند. کاتالاز علاوه بر این‌که H_2O_2 را از محیط حذف می‌کند کمبود اکسیژن حاصل از واکنش ملر را نیز جبران می‌نماید (آرورا و همکاران، ۲۰۰۰). در نتیجه ارتباط بین مقاومت به خشکی در اثر اعمال سیلیکون با فعالیت کاتالاز ممکن است علاوه بر نقش ضداکسندگی آن، به نحوه عمل این آنزیم در کاهش تنفس نوری نیز مرتبط باشد. طی این بررسی میزان فعالیت آنزیم SOD در اثر اعمال سیلیکون در مقایسه با تیمار خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵) به‌طوری‌که در اثر این تیمار ۴ آیزوزایم این آنزیم تظاهر یافت (شکل ۵). این نتایج توسط سایر پژوهش‌گران نیز گزارش شده است، آل‌آقاباری و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که تنش شوری باعث کاهش در فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD می‌گردد، در حالی‌که در تیمار سیلیکون فعالیت این دو آنزیم افزایش پیدا کرد. آنان بیان داشتند افزایش فعالیت این آنزیم‌ها تحت تیمار سیلیکون باعث کاهش در محتوای H_2O_2 سلول می‌گردد، در نتیجه مانع از خسارات اکسید کننده ناشی از H_2O_2 شده و باعث افزایش در وزن خشک گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری می‌گردد.

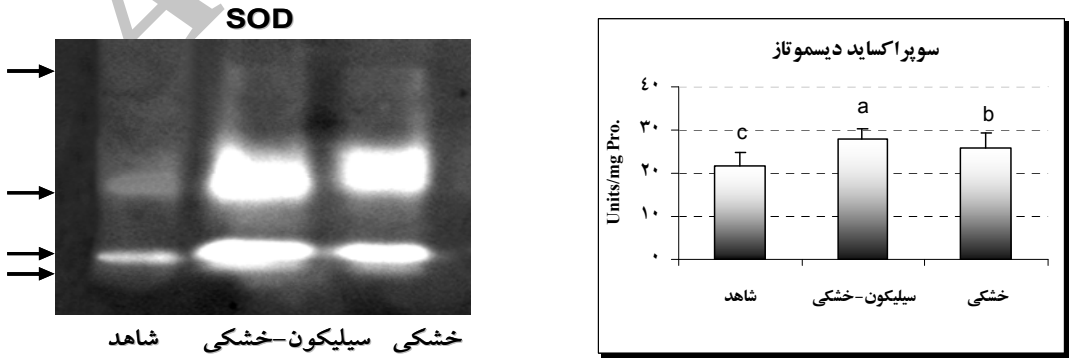
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳: تغییرات غلظت پروتئین محلول کل (سمت راست) و آشکارسازی آن بر روی ژل (سمت چپ)، در تیمار شاهد، سیلیکون-خشکی و خشکی



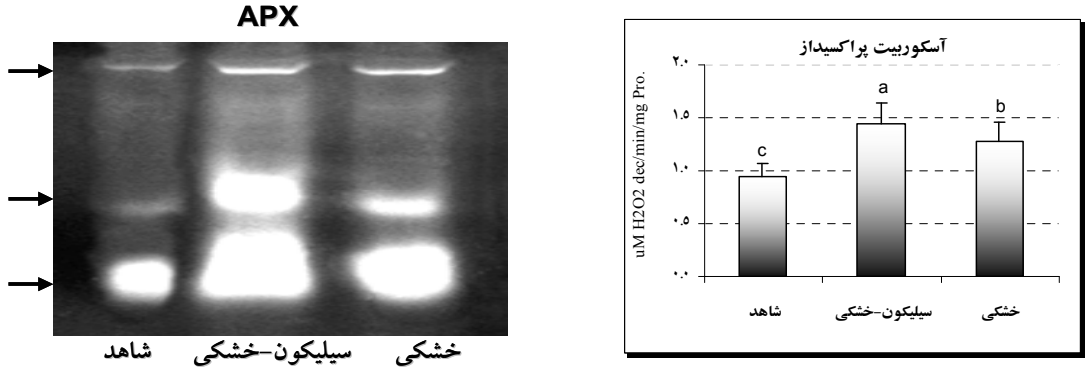
شکل ۴: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (سمت راست) و آشکارسازی آن بر روی ژل (سمت چپ)، در تیمار شاهد، سیلیکون-خشکی و خشکی



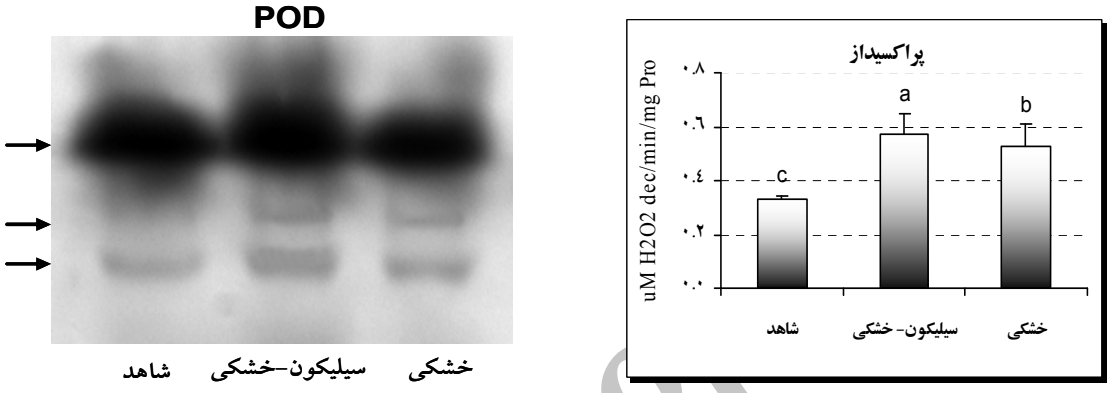
شکل ۵: تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (سمت راست) و آشکارسازی آن بر روی ژل (سمت چپ)، در تیمار شاهد، سیلیکون-خشکی و خشکی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶: تغییرات فعالیت انزیم آسکوربیت پراکسیداز (سمت راست) و آشکارسازی آن بر روی ژل (سمت چپ)، در تیمار شاهد، سیلیکون-خشکی و خشکی.



شکل ۷: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز (سمت راست) و آشکارسازی آن بر روی ژل (سمت چپ)، در تیمار شاهد،

جدول ۲: مقایسه میانگین های صفات اندازه گیری شده با استفاده از آزمون دانکن بر اساس تیمارهای اعمال شده (شاهد، سیلیکون-خشکی و خشکی)

تیمار	RWC	کلروفیل			پروتئین	آنزیم			
		a	b	کل	محلول کل	CAT	SOD	APX	POD
شاهد	۷۱/٦٤ a	۱/٤۷ a	۱/۰۲ a	۷/۷۸ a	٤۰ a	۰/٤۹٥ b	۲۱/۷۸ c	۰/۹۳۸ c	۰/۳۳۲ c
سیلیکون- خشکی	٦۳/۹۱ b	۱/۳۳ a	۰/۹۲۷ a	۷/۳۹ a	۳۳/۳ b	۰/٥٥٥ a	۲۷/۹۸ a	۱/٤٤ a	۰/٥۷۳ a
خشکی	٤٤/۳۷ c	۰/۷٦ b	۰/٤٥۰ b	۳/۷٥ b	۲٥/۸٦ c	۰/٥۰۲ b	۲٤/۷۸ b	۱/۲۸ b	۰/٥۲۱ b

میانگین‌های هر ستون که دارای حرف مشترک نیستند، با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار می باشند.

ژو و همکاران (۲۰۰۴) نیز نتایج مشابه‌ای را در اثر اعمال سیلیکون در محیط کشت نمونه‌های خیار که تحت تنش شوری قرار گرفته بودند گزارش کردند. آنزیم سوپراکساید دیسموتاز زداینده مهم رادیکال سوپراکساید در داخل سلول است که در تمام موجودات هوازی و غیر هوازی رادیکال سوپراکساید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. بنابراین با افزایش فعالیت این آنزیم در سلول میزان پراکسید هیدروژن نیز افزایش می‌یابد. در بافت‌های گیاهی دو آنزیم کاتالاز و آسکوربیت پراکسیداز نقش مهمی را در زدودن پراکسید هیدروژن ایفا می‌کنند، در نتیجه در راستای افزایش در فعالیت آنزیم SOD، افزایش فعالیت این دو آنزیم نیز قابل پیش‌بینی است. همان‌گونه که ذکر شد آنزیم کاتالاز قادر به زدایش H_2O_2 از محیط می‌باشد، اما از آنجائی‌که این آنزیم در پراکسی‌زوم سلول‌های برگی واقع شده و در کلروپلاست یافت نمی‌شود، در نتیجه H_2O_2 تولید شده در

Archive of SID
www.SID.ir

کلروپلاست به‌وسیله دو فرم tAPX و sAPX از محیط حذف می‌گردند. به همین دلیل در این بررسی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت آنزیم SOD و APX دیده می‌شود (*۰/۸۸۷) و به موازات افزایش فعالیت آنزیم SOD، میزان فعالیت آنزیم APX نیز افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر در اثر اعمال سیلیکون میزان فعالیت آنزیم APX در مقایسه با تیمار خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۶) در بین آنزیم‌های ضداکسنده آنزیم APX از توزیع درون سلولی بسیار خوبی برخوردار است ضمن آن‌که فضای بین سلولی و خارج سلولی را در کنترل خود دارد نوعی ارتباط بین این دو فضا برقرار کرده و بالاترین کارایی را در زدودن H_2O_2 دارد. سیستم پراکسیداز گیاهان به‌صورت آیزوفرم‌های چندگانه موجود است که به‌طور دقیق تنظیم شده و در پاسخ به محرک‌های محیطی فعال می‌گردد. افزایش در فعالیت این آنزیم از جمله پاسخ‌های عمومی به انواع تنش‌های اکسید کننده می‌باشد و گزارش شده است که ایزوزایم‌های پراکسیداز نقش کلیدی در مقاومت به تنش دارند. این آنزیم با استفاده از ترکیبات فنولی گئیکول به عنوان دهنده الکترون H_2O_2 را به آب احیاء می‌کند (شارما و دبی، ۲۰۰۵). در پژوهش حاضر افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر اعمال سیلیکون در مقایسه با شاهد، بیشتر از سایر آنزیم های مورد بررسی بود (شکل ۷). مطالعات صورت گرفته نشان داده است که میزان فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده در اثر حضور این ماده در گیاه افزایش یافته و با کاهش محتوای H_2O_2 و رادیکال‌های آزاد از تخریب سلول‌های گیاهی در برابر حمله ROS جلوگیری می‌کند. سیلیکون با محافظت از غشاهای سلولی از دسترسی پروتئازها به پروتئین‌های داخلی غشا و تخریب و بهم ریختگی غشاء سلولی ممانعت می‌کند (موسی، ۲۰۰۶؛ گانگ و همکاران ۲۰۰۵؛ لیانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تیمار سیلیکون باعث افزایش در محتوای RWC، رنگدانه های فتوسنتزی، پروتئین محلول کل و هم‌چنین افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده CAT، SOD، APX وPOD در مقایسه با تیمار خشکی می‌گردد. هم‌چنین تغییراتی که در مورد نحوه بیان و فعالیت آیزوزایم‌های این آنزیم‌ها بر روی ژل اکریل آمید مشاهده شد، بر اساس نتایج حاصل از سنجش اسپکتروفتومتری قابل پیش‌بینی بود. مطالعه الگوی باندی آیزوزایم‌های این آنزیم‌ها، روی ژل اکریل آمید نشان دهنده این است که می‌توان ظهور و شدت باندهای آیزوزایمی مرتبط با افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار سیلیکون را به‌عنوان نشان‌گرهای بیوشیمیایی پاسخ به تنش خشکی در نظر گرفت. در نتیجه سیلیکون علاوه بر اثرات مکانیکی که در ایجاد مقاومت به تنش در گیاه ایجاد می‌نماید، با تاثیر بر روی فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی از سلول‌های گیاهی در برابر خسارات ناشی از تنش‌های اکسید کننده محافظت می‌کند. پیشنهاد می‌گردد اثرات این ماده بر روی ارقام حساس و مقاوم به خشکی و نیز در شرایط مزرعه‌ای نیز مورد بررسی قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Aebi, H. E. 1984. Catalase *in vitro*. Method s Enzymology, 105: 121-126.

AL-Aghabary, K., Zhujun, Z. and Qinhua, S. 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. Plant Nutrition, 27: 2101-2115.

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Poly pheol oxide in *Beta vulgaris*. Plant Physiolgy, 24: 1-15.

Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G. and Strasburg, G. M. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 373: 102–109.

Bai, L. and Sui, F. 2006. Effect of soil drought stress on leaf of maize. Pedosphere, 16: 326-332.

Beachamp, C. and Fridovich, F. 1971. Superoxide dismutase: cadmium assay and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem, 44: 276-27.

Bradford, M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Chance, B., Maehly, A. 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymol, 2: 764-817.

Epstein, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. Proceedings of the National Academy of Science, 91: 11-17.

Epstein, E. 1999. Silicon. Plant Physiology, 50: 641-664.

Gong, H. Z., Chen K., Wang S. and Zhang C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. Elesevier Science, Shannon, IRLANDE, 169: 313-321.

Hart M. A., Tyson H. and Bloomberg B. 1971. Measurement of activity of peroxidase isoenzymes in flax. Bioch Biophy Rec Commun, 92:247-250.

Johnson, R. C., Nguyen, H. T. and Croy, L. 1984. Osmotic adjustment and solute accumulation in two wheat genotype differing in drought resistance. Crope Science, 24: 947-962.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Li, Q. F., Ma, C. C. and Shang, Q. L. 2007. Effects of silicon on photosynthesis and antioxidative enzymes of maize under drought stress. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 18: 531-536.

Liang, Y., Chen, Q., Zhang, W. and Ding, R. 2003. Exogenous silicon increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in root of salt-stressed bareley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Physiology, 160: 1157-67.

Mussa, H. R. 2006. Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). Agriculture and Biology Journal, 2: 293-297.

Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Phsiology, 28: 131-140.

Oncel, I., Keles, Y. and Ustun, A. S. 2000. Interactive of temperature and heavy metal stress on the growth ond some biological compounds in wheat seedling. Environmental Pollution, 107: 315-320.

Oosten, V., Wilkins, D. and Bestford, R. T. 1995. Acclimation of tomato different carbon dioxide concenteration relationships between biochemistry and gas exchange during leaf development. New Phytology, 130: 357-367.

Ranjan, R., Bohra, S. P. and Jeet, A. M. 2001. Plant Senescence. Jodhpur, Agrobios, pp.18-42.

Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. 1996. Ultraviolet-B and ozone- induced of protein biochemical change in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 110: 125-136.

Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Annual Biochem, 167: 290-294.

Rybicki, E. D and Purves, M. 2003. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Dept Microbiology, University of Cape Town.

Archive of SID

www.SID.ir

Sang, G. K., Ki, W. K., Eun, W. P., and Doil, C. 2002. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. Phytopathology, 92: 1095-1103.

Sharma, P. and Dubey, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation, 46: 209-221.

Turkan, I., Bor M., Ozdemir, F. and Koca, H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought–tolerant *P. acutifolius* Gray and drought–sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science ,168: 223-231.

Turner, N. C. 1981. Techniques and experimental approaches for measurement of plant water status. Plant and Soil, 58: 339 – 366.

Yong, Y., Tai S. and Bao, X. 2007. Effects of silicon on photosynthesis and antioxidative enzymes of maize under drought stress. Plant Science, 18: 531-536.

Zhu, Z., Wei, G., Li J., Qian, Q. and Yu, J. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Science, 167: 527-533.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of Silicon on Drought Tolerance in Wheat

Tale Ahmad[1*], S. and Haddad[2], R.

Abstract

The effect of exogenous silicon (Si) on the activity of the major antioxidant enzymes including catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress was investigated. Complete randomized design was performed with three treatments control, drought and silicon-drought (1 mmol silicate sodium kg^{-1}) and three replications in the green-house. Result showed that compared to the plants treated with drought alone, Si treatment caused to increase the activity of CAT, SOD, APX, and POD and also the contents of photosynthetic pigments and soluble protein under drought-stressed leaves. There was no significant difference in CAT activity between the drought and control treatments. Moreover, among the all studied enzymes, POD revealed the highest activity under silicon treatment. It is concluded that higher activity of antioxidant enzymes and isoenzymes electrophoretic banding patterns are depended to the silicon treatment. Moreover, Si causes to protect the plant tissues from oxidative damage under drought stress. The results of the present experiment coincided with the conclusion that Si may be involved in the metabolic or physiological changes to increase drought tolerance in wheat plant.

Keywords: Wheat, Drought tolerant, Antioxidant enzymes, Silicon

Archive of SID

1. MS of Plant Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj
2. Faculty member of Agricultural Biotechnology of Imam Khomeini International University, Qazvin
*. *Corresponding Author*

www.SID.ir