

نقش سیلیکون در فعالیت مولکولی ژن‌های ضد اکسندۀ جو تحت تنش خشکی

رویا حیدری^۱، رحیم حداد^{۲*}

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

۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۵)

Silicon rule in molecular activity of barley antioxidant genes under drought stress

Roya Heidari¹, Raheem Haddad^{2*}

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University. Qazvin, Iran

2. Associated Professor, Agricultural Biotechnology Department, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

(Received: Mar. 9, 2015 - Accepted: Jun. 15, 2015)

Abstract

Silicon is accounted as one of the elements that induces resistance to different kinds of stresses especially drought stress in plants. In this study, the effect of silicon was analyzed on the activity of antioxidant enzymes Catalase, Ascorbate peroxidase and Superoxide dismutase and also related genes expression pattern and H₂O₂ content on two varieties, NIMROOZ (drought resistant) and GORGAN (semi-resistant) under three treatments of drought, silicon-drought and control in a completely randomized design with three replications in four leaf developmental stage in a green house. Based on the results of factorial test, catalase activity was decreased in semi-sensitive variety and silicon treatment increased such activity in both varieties under drought stress. While the activity of two other enzymes (Ascorbat peroxidase and Superoxide dismutase) was increased under drought stress and silicon treatment intensified their activity in comparison with control. Their pattern of gene expression changed in a similar way of enzyme activity. It might be concluded that, the role of silicon in enhancing drought tolerance in barley plant is because of increasing activity of antioxidant enzymes and expression of stress responsible genes, and therefore, causes reduction in activity of reactive oxygen species produced under drought stress.

Keywords: Antioxidants enzymes, Gene expression, Drought stress, barley, Silicon.

چکیده

سیلیکون از جمله عناصری است که باعث القای مقاومت به انواع تنش - ها به ویژه تحت تنش خشکی در گیاهان می‌شود. در این پژوهش به بررسی اثر سیلیکون در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندۀ کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و الگوی بیان ژن‌های مربوطه و محتوای هیدروژن پراکساید بر روی دو رقم نیمروز (مقاوم به خشکی) و گرگان (رقم نیمه حساس) در مرحله چهار برگ، تحت سه تیمار خشکی، سیلیکون-خشکی و شاهد به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه پرداخته شد. بر اساس نتایج تجزیه، میزان فعالیت آنزیم CAT تحت تنش خشکی در رقم حساس کاهش و تیمار سیلیکون در هر دو رقم باعث افزایش آن گردید. در صورتیکه فعالیت دو آنزیم دیگر (آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) در اثر تنش خشکی افزایش یافته و تیمار سیلیکون باعث تشدید فعالیت آن‌ها نسبت به شاهد شد. الگوی بیان ژنی فعالیت این آنزیم‌ها مشابه با تغییرات آنزیمی آنها بود. از نتایج حاصل از این آزمایش می‌توان چنین نتیجه گرفت که نقش سیلیکون در افزایش تحمل به تنش خشکی در گیاه جو بدلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسندۀ و تشدید بیان ژن‌های مسئول پاسخ به تنش بوده و احتمالاً باعث کاهش آسیب‌های ناشی از فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن حاصل تحت تنش خشکی شده است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های ضد اکسندۀ، بیان ژن، تنش خشکی، جو، سیلیکون.

مقدمه

تنش خشکی به تنهایی مهمترین تهدید برای امنیت غذایی جهان محسوب می‌شود. خشکی به شرایطی اطلاق می‌شود که در آن سلول‌ها و بافت‌ها در وضعیتی قرار می‌گیرند که تورژسانس آن‌ها کامل نباشد. تنش خشکی که موجب از دست دادن آب به صورت بخار می‌شود را تنش اسمزی می‌گویند (Levitt, 1980). شدت تنش خشکی غیرقابل پیش‌بینی است و به فاکتورهای بسیاری مانند وقوع و توزیع بارندگی، میزان تبخیر و قابلیت ذخیره رطوبت در خاک‌ها بستگی دارد (Shahryari and Mollasadeghi, 2011). ایران با متوسط نزولات آسمانی ۲۵۰ میلی‌متر در زمره مناطق خشک جهان طبقه‌بندی می‌گردد. بالا بودن مقدار تبخیر و تعرق، محدودیت منابع آبی و سایر عوامل باعث توجه بیشتری به مطالعه اثرات تنش خشکی بر گیاهان زراعی و انتخاب ارقام مقاوم به خشکی شده است. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند آنیون سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پروکساید (H_2O_2) و هیدروکسیل (OH) تحت تنش خشکی تولید و تجمع می‌یابد (McCord, 2000). اگرچه ROS نقش‌های علامت‌دهی مهمی را در کنترل فرایندهایی مانند رشد، توسعه و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی محیطی و مرگ برنامه ریزی شده سلول در گیاهان ایفا می‌کنند (Bailey and Mittler, 2006)، ولی در غلظت‌های بالا می‌توانند منجر به آسیب‌هایی در سطوح مختلف در کلروپلاست شوند. متابولیسم ROS ها بستگی به سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان مانند فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) دارد. آنزیم SOD تبدیل خود به خودی رادیکال‌های آزاد سوپراکسید را به H_2O_2 در سیتوپلاسم، کلروپلاست و میتوکندری تسریع می‌کند (Beyer et al., 1991). H_2O_2 تولید شده توسط SOD از طریق فعالیت آنزیم‌های CAT و APX و

تبدیل آن به H_2O و O_2 سم‌زدایی می‌شود. آنزیم APX نسبت به دو آنزیم POD و CAT تمایل بیشتری به H_2O_2 دارد. سیلیکون (Si) دومین عنصر فراوان در خاک و یک سوبسترای معدنی برای زندگی اکثر گیاهان جهان است. این عنصر به صورت آزاد در دسترس نبوده و به صورت ترکیب با سایر عناصر و به صورت اکسید در خاک موجود است (Epstein, 1999). در بیشتر موارد Si عنصر مفیدی تا زمان بروز تنش به حساب نمی‌آید. اگرچه Si به عنوان یک عنصر ضروری در نظر گرفته نشده، اما در مطالعات متعددی نقش مثبت آن در رشد و افزایش محصول به اثبات رسیده است (Balakhnina et al., 2012). اعمال محافظتی که به Si نسبت داده می‌شود شامل بهبود توسعه غذایی، کاهش سمیت مواد معدنی، بهبود ویژگی‌های مکانیکی در بافت‌های گیاهی و بهبود مقاومت به انواع تنش‌های غیر زنده (شوری، سمیت فلزی، عدم تعادل غذایی، خشکی، تشعشع، دمای بالا، انجماد، UV) و تنش‌های زنده می‌شود (Ma and Yamaji, 2006). مطالعات انجام شده نشان از اهمیت عنصر Si در افزایش قابلیت گیاهان در مقاومت به انواع تنش‌ها دارد. طی مطالعه‌ای که بر روی گیاه جو صورت پذیرفت نتایج نشان دادند که Si خارجی به میزان زیادی فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GR را در ریشه‌های گیاهان تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد (Liang et al., 2003). همچنین در پژوهشی که بر روی گیاه خیار انجام شد مشاهدات حاکی از این بود که افزودن Si باعث افزایش فعالیت SOD، GPX و APX در خیار تحت تنش خشکی می‌شود (Zhu et al., 2004). در مطالعه‌ای که بر روی ساقه‌های زیرزمینی رشد کرده در شرایط سمیت بور، شوری و شوری-سمیت بور بر روی درخت انگور انجام شد، افزودن Si فعالیت SOD و CAT را کاهش و APX را افزایش داد. در بررسی تاثیر سیلیکون بر سمیت آلومینیوم مشاهده شد که تیمارهای Si باعث کاهش اثرات سمی

خاک جوانه بزنند و تا رسیدن به مرحله مورد نظر، گلدان‌های شاهد هر روز آبیاری شده و گلدان‌های خشکی و خشکی-سیلیکون، زمانی که بلوک گچی پتانسیل آب ۲۵-۱۵ MPa نشان داد آبیاری آن‌ها را کمتر کرده و زمانی که پتانسیل آب به ۱/۵ MPa- رسید آبیاری متوقف شد.

بررسی فعالیت آنزیمی

به منظور بررسی فعالیت آنزیمی در تیمارهای مختلف، نمونه‌های یک رنگ و سالم از پارانشیم در مرحله چهار برگی برداشت در ورقه آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله در نیتروژن مایع تثبیت و به دمای ۸۰- درجه منتقل گردید. ابتدا پروتئین محلول کل گیاه به روش اندرسون و همکاران (Enderson *et al.*, 1995) استخراج شد. در این روش ۱ گرم نمونه برگی به هاون استریل منتقل و به کمک ازت مایع بافت خورد شد. سپس زمانی که ۵۰٪ بافت خورد شد ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) به آن اضافه شد. پس از خرد شدن کامل، بافت را به فالدکون انتقال و ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=7 و سدیم متابای سولفیت ۱ میلی‌مولار) به آن اضافه شد. نمونه در ۱۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ فاز بالایی که حاوی پروتئین‌های محلول نمونه بود، با سمپلر کشیده و ۱/۵ میلی‌لیتر از آن با ۰/۵ میلی‌لیتر از گلیسرول (v/v) ۵۰٪ مخلوط و ورتکس و سپس نمونه پس از تثبیت در نیتروژن مایع، به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (Labomed مدل UV-320) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم CAT (EC 1.11.1.6) بر اساس روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. محلول‌هایی که برای سنجش فعالیت ویژه این آنزیم استفاده شد شامل ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰

آلومینیوم در گیاهان جو می‌شود. جذب آلومینیوم توسط ریشه‌ها در حضور عنصر Si به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (Hammond *et al.*, 1995). در پژوهش دیگری نتایج حاصل نشان داد که برخلاف فعالیت SOD و CAT، فعالیت APX در گیاه جو به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گیاهان رشد کرده در شرایط بدون Si بوده است. از این آزمایش می‌توان به این نتیجه رسید که APX احتمالاً مهمتر از CAT در سم زدایی H₂O₂ بوده و لذا تحمل به تنش اکسیداتیو را بهبود می‌بخشد (Gong *et al.*, 2005).

هدف از این پژوهش بررسی اثر Si در محتوای H₂O₂، تغییر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده CAT، APX و SOD و نیز مطالعه الگوی بیانی ژن‌های مربوطه به منظور افزایش مقاومت گیاه جو به تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

بذر دو رقم گیاه جو به نام‌های نیمروز (رقم مقاوم به خشکی) و گرگان (رقم نیمه حساس) از موسسه اصلاح بذر کرج تهیه شد. این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو عامل رقم و سطوح مختلف خشکی شامل شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی (۱۶ میلی‌گرم سیلیکات سدیم به ازای هر کیلوگرم خاک) در سه تکرار طی سال زراعی ۹۱-۹۲ در گلدان‌های پلاستیکی با ترکیبی از ماسه، خاک زراعی و مواد آلی به نسبت ۱:۱:۱ کشت شد. برای ایجاد تنش خشکی از بلوک گچی استفاده گردید و سیلیکات سدیم را با آب مخلوط کرده و به گلدان‌های تحت تیمار سیلیکون-خشکی اضافه شد. ابتدا تمام گلدان‌ها را به اندازه ظرفیت زراعی‌شان آبیاری کرده تا بذرها در داخل

۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم، ۱ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم، ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرو استیک‌اسید و ۲۵۰ میکرولیتر آب برای بلنک کردن دستگاه اسپکتروفتومتر بود. برای رسم منحنی استاندارد در طول موج ۳۹۰ نانومتر از مواد بالا استفاده شد، منتها به جای آب از ۲۵۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴) استفاده گردید. برای سنجش غلظت نمونه‌ها نیز به جای آب از ۲۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده استفاده شد.

استخراج RNA کل

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-plus شرکت سیناکلون طبق دستورالعمل مربوطه صورت گرفت. به منظور تعیین کیفیت و غلظت سنجی RNA استخراج شده، از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. غلظت RNA کل توسط فرمول "ضریب رقت $\times 40 \times$ جذب 260 نانومتر = $(\mu\text{g/ml})$ غلظت RNA" محاسبه شد. قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، از آنزیم DNaseI شرکت Fermentase استفاده گردید. جهت هضم DNA ژنومی، میزان $1 \mu\text{g}$ از RNA با $1 \mu\text{l}$ از آنزیم DNase I و $1 \mu\text{l}$ از بافر مخلوط گردیده و با آب مقطر DEPC (دی‌اتیل‌پیرو کربنات) به حجم $1 \mu\text{l}$ رسانده شد. تیوب‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به منظور غیرفعال کردن فعالیت آنزیم، به میزان $1 \mu\text{l}$ EDTA اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت RNA به دمای -80 درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. به منظور تهیه cDNA کیت سنتز RevertAid M-Mul شرکت سیناکلون بر طبق دستورالعمل مورد استفاده قرار گرفت. غلظت RNA مورد استفاده 1 میکروگرم بود. به منظور طراحی آغازگرهای واکنش، توالی ژن‌های مورد نظر

میلی‌مولار محلول در فسفات‌پتاسیم 100 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، 750 میکرولیتر بافر فسفات‌پتاسیم 100 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، 1500 میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل بود. منحنی فعالیت آنزیم CAT در طول موج 240 نانومتر و مدت زمان 180 ثانیه و بر حسب Abs/min ترسیم گردید. الکتروفورز آنزیم کاتالاز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد صورت گرفته و رنگ‌آمیزی اختصاصی آن به روش Robertson *et al.* (1987) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم APX (EC 1.11.1.11) به روش Nakano and Aseda (1983) اندازه‌گیری گردید. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات‌پتاسیم یک مولار با $\text{pH}=7/8$ آسکوربات 10 میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار و میکرولیتر عصاره بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسیدشدن آسکوربات در طول موج 290 نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $2/8$ تعیین گردید. الکتروفورز آنزیم APX در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و ولتاژ 80 صورت گرفت و رنگ‌آمیزی اختصاصی ژل به روش Rao *et al.* (1996) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم SOD (EC 1.15.1.1) به روش Beachamp and Fridovich (1971) اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم از طریق توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در جلوگیری از احیای نوری ماده شیمیایی نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) به فورمازون و در طول موج 560 nm اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای SOD در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید (Evans, 2001). الکتروفورز این آنزیم در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجام و رنگ‌آمیزی به روش Beachamp and Fridovich (1971) صورت گرفت. به منظور بررسی تاثیر Si بر فعالیت‌های آنزیمی، میزان H_2O_2 برگی نیز اندازه‌گیری شد. استخراج H_2O_2 به روش Nakano and Asada (1981) انجام شد. محلول واکنش 2 میلی‌لیتر شامل

قطعه انجام شد. پس از اطمینان از سنتز cDNA واکنش‌های زنجیره‌ای PCR برای سایر ژن‌ها نیز به طور اختصاصی صورت پذیرفت. شدت باندهای حاصل توسط نرم‌افزار Image J مورد سنجش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری فعالیت آنزیمی و سنجش شدت بیان در سطح mRNA توسط نرم‌افزار SPSS و Excel انجام شد.

از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج و با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 طرحی صورت پذیرفت (جدول ۱). از ژن ACTIN به عنوان ژن خانه‌دار استفاده و میزان بیان سایر ژن‌ها با آن مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت واکنش Semi-qRT-PCR جهت بررسی سنتز cDNA در ۳۵ چرخه دمایی و دمای ذوب ویژه ژن CATIN و همچنین زمان اتصال مناسب طول

جدول ۱. توالی آغازگر ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	توالی آغازگر	Tm°C	طول قطعه
ACTIN- Upper	ACC CAA AAG CCA ACA GAG AG	58.4°C	143 bp
ACTIN- Lower	ACC ATC ACC AGA GTC GAG AA		
CAT- Upper	GTT CGC CGT CAA GTT TTA CA	56.4°C	72 bp
CAT- Lower	ATG AAG AAG ACG GGG AAG TT		
APX- Upper	CTC AGG CAG GTG TTT TCC A	58.5°C	182 bp
APX- Lower	CCT TCC TTC TCC CCA CTC A		
SOD- Upper	ACG TTC GTA TCA CTG GAC TT	55.7°C	78 bp
SOD- Lower	TGC ATC CAT TAG TCG TGT C		

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و الگوی بیانی آن‌ها تحت تاثیر تنش خشکی و تیمار Si قرار گرفته و در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). اندامک‌های سلولی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم‌ها با فعالیت‌های سنگین اکسیداسیون، یا با شدت بالای جریان الکترون، یک منبع عظیم تولید ROS در سلول‌های گیاهی به حساب می‌آیند. گیاهان به منظور خنثی کردن اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن از دو سیستم ضد اکسندگی آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌کنند. آنزیم‌های CAT، APX و SOD جزو مهمترین آنزیم‌های تنشی محسوب می‌شوند (Arora et al., 2002). مجموع فعالیت این آنزیم‌ها و تنظیم سطوح فعالیت آن‌ها در گیاهان تحت تنش نقش بسیار مهمی را در افزایش مقاومت ایفا می‌کند.

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش میزان

فعالیت آنزیم CAT تحت تنش خشکی در رقم مقاوم افزایش و در رقم نیمه‌حساس کاهش یافت. حضور Si در هر دو رقم به طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش فعالیت آنزیم CAT در هر دو رقم تحت تنش خشکی شد (شکل ۱). میزان بیان ژن CAT نیز به طور مشابهی در گیاه تحت تنش کاهش و تیمار Si باعث تشدید آن شد (شکل ۲). نتایج Native-PAGE (شکل ۳) و ژل آگاروز (شکل ۴) نشان‌دهنده تاثیر Si بر فعالیت آنزیمی و بیان ژن است. این نتایج مبین واکنش بیشتر رقم حساس به تغییرات CAT می‌باشد. در مطالعه‌ای کاهش در میزان فعالیت آنزیم CAT را در مرحله جوانه‌زنی برنج تحت تنش خشکی گزارش شده است (Sharma and Dubey, 2005). در پژوهشی دیگر میزان بیان و فعالیت آنزیم CAT و تجمع H₂O₂ را در گیاه گندم تحت تنش خشکی بررسی شد. در این آزمایش محققین مشاهده کردند که تنش خشکی باعث کاهش میزان فعالیت آنزیمی و بیان ژن CAT

گندم بدلیل افزایش در فعالیت آنزیم‌های ضد اکسند همراهِ بوده و باعث کاهش خسارات اکسیدکنندگی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن که تحت تنش خشکی تولید می‌گردند می‌شود و از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهانی که در معرض تنش قرار گرفته‌اند محافظت می‌کند (Tale Ahmad and Haddad).

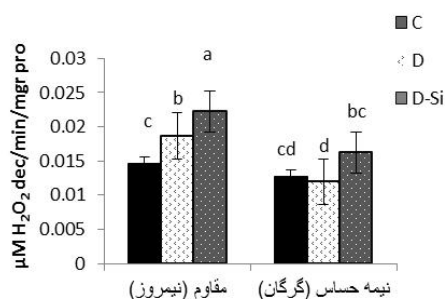
می‌شود (Luna et al., 2005). همچنین در مطالعه مشابهی که نشانگر تاثیر Si بر گیاه گندم تحت تنش خشکی بوده، افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در گیاه تحت تنش در حضور Si گزارش شد. از نتایج حاصل از این آزمایش می‌توان چنین استنباط کرد که نقش Si در افزایش تحمل به خشکی

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی

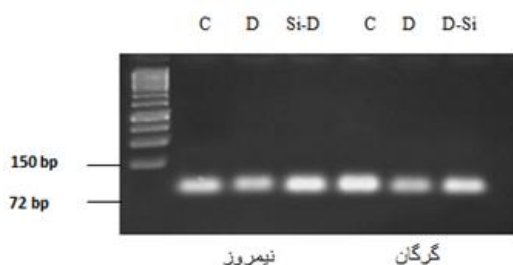
S.O.V.	منبع تغییرات	میانگین مربعات (MS)							
		کاتالاز درجه آزادی	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیلاز	ژن کاتالاز	ژن سوپراکسید دیسموتاز	ژن آسکوربات پراکسیلاز	پراکسید هیدروژن H2O2	
		df	CAT	SOD	APX	CAT gene	SOD gene	APX gene	H2O2
Treatment (T)	تیمار (ت)	۲	۰,۰۰۰**	۲۹,۷۹۳**	۰,۰۰۳**	۲۳۶,۶۸۶**	۸۱۶,۱۰۷**	۹۰۰,۲۵۷**	۶۲۷۳,۵۱۵**
Genotype (G)	ژنوتیپ (ژ)	۱	۰,۰۰۱**	۵۶۱,۵۹۴**	۰,۰۰۸**	۳۱۸۴,۴۰۶**	۱۲۵۲,۲۶۸**	۱۳۱,۰۵۰**	۹۷۶,۹۶۷**
T × G	ت × ژ	۲	۴,۲۱ns	۱,۶۰۱ns	۰,۰۰۱**	۸۲,۹۹۴**	۱۴۹,۹۷۵**	۳۵۵,۶۲۴**	۱۰۱۰,۰۴۴**
Error	خطا	۱۲	۲,۲۱	۱,۱۷۲	۳,۱۰۱	۱۰,۵۵۸	۹,۹۱۶	۱,۴۶۰	۶,۴۶۲
C.V. (%)	درصد ضریب تغییرات		۹,۳۷۴	۱۶,۳۱	۲۲,۸۹۵	۱۹,۶۴۸	۱۳,۶۸۳	۲۱,۵۵۸	۲۳,۲۴۳



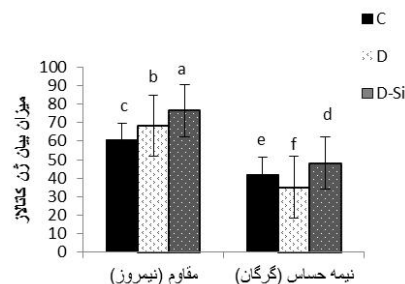
شکل ۳. رنگ‌آمیزی ژل Native-PAGE ویژه آنزیم CAT در ارقام مورد بررسی. تیمار سیلیکون-خشکی (Si-D) باعث افزایش فعالیت آنزیمی شد.



شکل ۱. میزان فعالیت آنزیم CAT در دو رقم مقاوم و نیمه حساس تحت تنش خشکی (D) و سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تیمار سیلیکون فعالیت آنزیمی را افزایش داد.



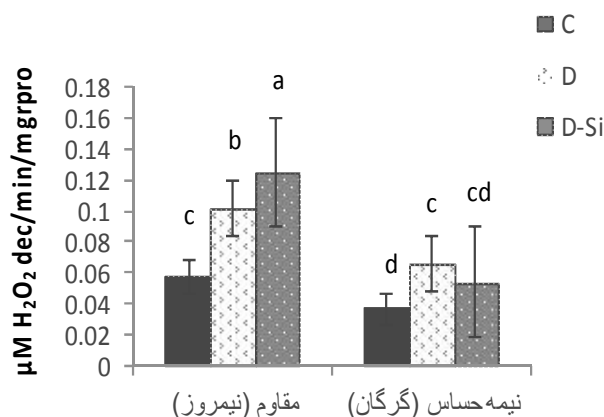
شکل ۴. ژل آگاروز ژن CAT و شدت باندها بعد از ۳۵ چرخه در ارقام مورد بررسی. تیمار سیلیکون-خشکی (Si-D) باعث افزایش بیان ژن موردنظر شد.



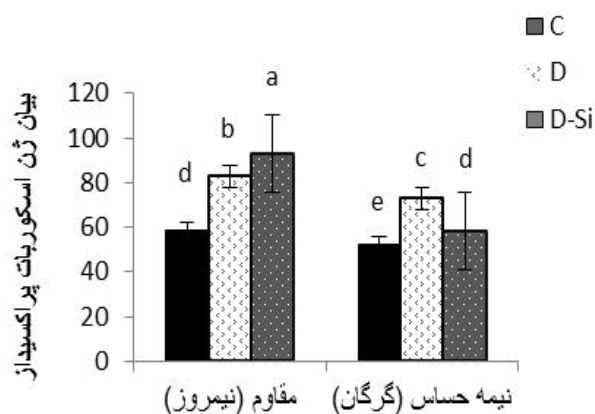
شکل ۲. میزان بیان ژن CAT در دو رقم مقاوم و نیمه حساس تحت تنش خشکی (D) و سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تیمار Si موجب افزایش بیان ژن CAT شد.

گزارش کردند که سطوح رونویسی APX به طور قابل ملاحظه‌ای در پاسخ به نور شدید افزایش می‌یابد، اما در پاسخ به سایر تنش‌ها تغییری نشان نمی‌دهد. آنها استدلال کردند که سطوح رونویسی ایزوزیم‌های کلروپلاستی (cAPX) تحت تنش نور شدید که یک تنش اکسیدکننده نوری است، افزایش می‌یابد (Yoshimura *et al.*, 1999). همچنین افزایش در فعالیت آنزیم‌های SOD، GPX و APX در گیاه خیار تحت تنش خشکی نیز تحت تیمار Si گزارش شده است (Zhu *et al.*, 2004).

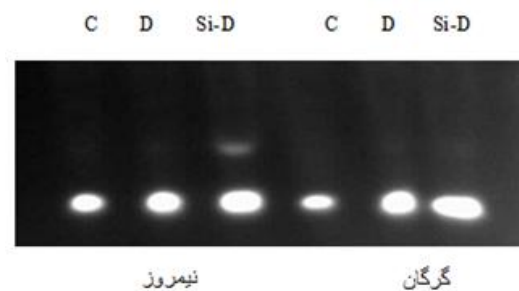
در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم APX (شکل ۵) و الگوی بیانی ژن آن (شکل ۶) در مقایسه با ژن خانه‌دار ACTIN تحت تنش خشکی افزایش یافت. تیمار Si به طور معنی‌داری میزان فعالیت آنزیمی و بیان ژن APX را نسبت به شاهد تشدید کرد. نتایج فوق در بررسی ژل Native-PAGE (شکل ۷) و ژل آگاروز (شکل ۸) مشهود است. در آزمایشی که بر روی بیان ایزوزیم‌های ژن APX در برگ‌های گیاه اسفناج و در پاسخ به تنش‌های اکسنده از جمله شدت نور، شوری، خشکی و آبسزیک اسید انجام شد، پژوهشگران



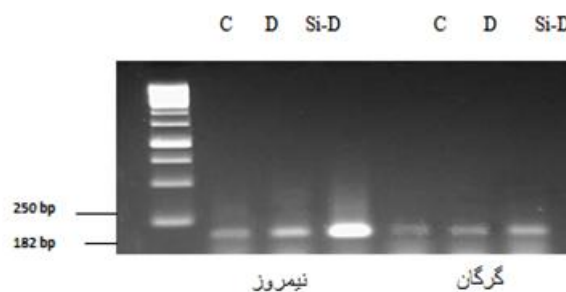
شکل ۵. فعالیت آنزیم APX دو رقم مقاوم و نیمه‌حساس تحت سه تیمار خشکی (D)، سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تیمار سیلیکون-خشکی باعث تشدید فعالیت آنزیم در رقم مقاوم شد.



شکل ۶. بیان ژن APX در دو رقم مقاوم و نیمه‌حساس تحت سه تیمار خشکی (D)، سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تیمار سیلیکون-خشکی سبب افزایش بیان ژن APX در رقم مقاوم شد.



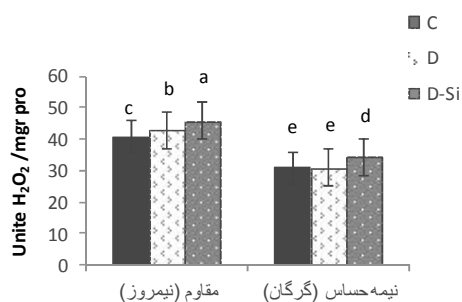
شکل ۷. رنگ‌آمیزی Native-PAGE ویژه آنزیم APX در ارقام مورد بررسی. تیمار سیلیکون-خشکی (Si-D) باعث افزایش فعالیت آنزیم در گیاه تحت تنش خشکی شد.



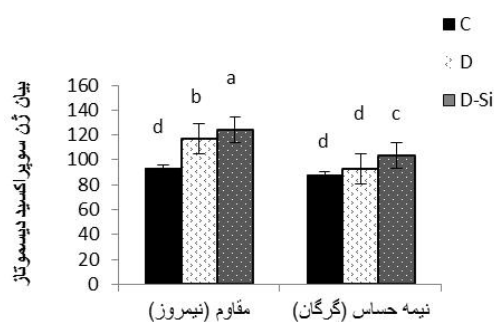
شکل ۸. بیان ژن APX بعد از ۳۵ چرخه PCR در ارقام مورد بررسی. میزان بیان ژن APX در رقم مقاوم و تحت تیمار سیلیکون-خشکی (Si-D) به مقدار زیادی افزایش یافت.

بر میزان فعالیت ضد اکسند ه‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در رقم اسفناج تحت تنش خشکی بررسی و نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم SOD در برخی ارقام کاهش و در برخی دیگر افزایش می‌یابد (Gunes *et al.*, 2007)، در صورتی‌که در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم مورد نظر در تیمار سیلیکون در تمام ارقام افزایش نشان داده است. در آزمایشی اثر Si در افزایش تحمل به خشکی در دو ژنوتیپ گندم (*Triticum aestivum*) (L. بررسی و معلوم شد که Si با افزایش در فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX و POD و پروتئین محلول کل در هر دو ژنوتیپ گندم باعث جبران خسارات ناشی از تنش خشکی می‌گردد (Tale Ahmad and Haddad, 2011). همچنین نتایج نشان دادند که Si خارجی به میزان زیادی فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GR را در ریشه‌های گیاهان جو تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد (Liang *et al.*, 2003).

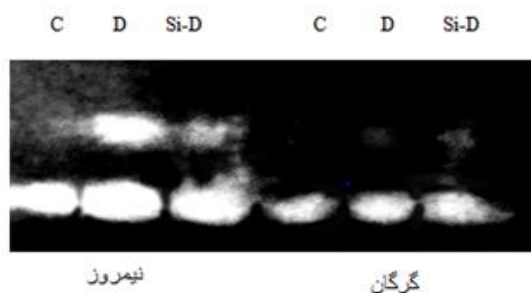
در تحقیق حاضر افزایش در میزان فعالیت آنزیم SOD (شکل ۹) و بیان آن (شکل ۱۰) تحت تنش خشکی در رقم مقاوم مشاهده شد و تیمار Si نیز موجب تشدید میزان فعالیت و بیان آن گردید. البته میزان فعالیت آنزیم در رقم مقاوم نسبت به رقم نیمه حساس بیشتر بود. ژل Native-PAGE (شکل ۱۱) و ژل آگاروز (شکل ۱۲) بیانگر این افزایش است. طی مطالعه-ای که توسط تعدادی از پژوهشگران صورت گرفت نتایج نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی SOD در گیاه چمن خم تحت تنش خشکی در حضور Si است (Schmidt *et al.*, 1999). در آزمایشی الگوی بیانی ژن SOD در گیاه ذرت تحت تنش خشکی بررسی شده و تاثیر تنش آبی بر روی ایزوژیم‌های SOD دو ژنوتیپ مقاوم و حساس مطالعه شد. نتایج نشان داد که رونویسی Mn-SOD و Fe-SOD در گیاه مقاوم به میزان بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس بیان می‌شود (Shiriga *et al.*, 2014). همچنین اثرات سیلیکون را



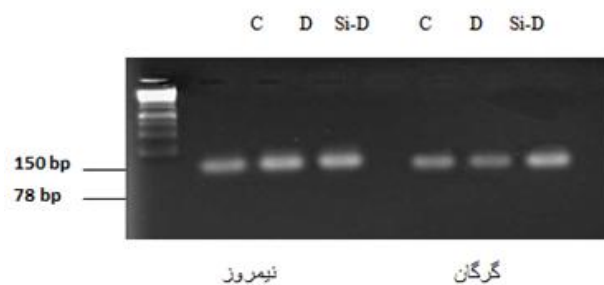
شکل ۹. فعالیت آنزیم SOD در دو رقم مقاوم و نیمه حساس تحت تنش خشکی (D)، سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیمی شد و تیمار سیلیکون-خشکی فعالیت آنزیم SOD را تشدید کرد.



شکل ۱۰. فعالیت آنزیم SOD در دو رقم مقاوم و نیمه حساس تحت تنش خشکی (D)، سیلیکون-خشکی (Si-D) و کنترل (C). تیمار سیلیکون-خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم SOD شد.



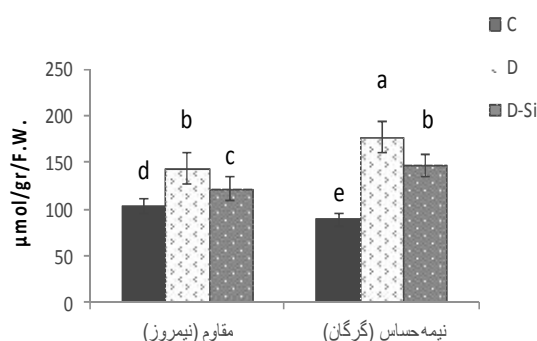
شکل ۱۱. رنگ آمیزی Native-PAGE ویژه آنزیم SOD در ارقام مورد بررسی. تیمار سیلیکون-خشکی (Si-D) باعث افزایش فعالیت آنزیمی در گیاه تحت تنش خشکی شد.



شکل ۱۲. بیان ژن SOD بعد از ۳۵ چرخه PCR در ارقام مورد بررسی. میزان بیان ژن SOD بر اساس ژل در رقم مقاوم و تحت تیمار سیلیکون-خشکی به مقدار زیادی افزایش یافت.

بر روی گیاه است. حضور آنزیم‌های ضد اکسنده مانع از تبدیل H_2O_2 به اشکال فعال OH° (رادیکال هیدروکسیل) شده و بلافاصله آن را به H_2O و O_2 تبدیل می‌کنند (Beyer *et al.*, 1991). در مطالعه‌ای مشابه پژوهشگران اعلام کردند که کاربرد Si در خاک گیاه تحت تنش خشکی آسیب‌غشاء در ریشه‌ها را از طریق کاهش سطوح H_2O_2 در گیاه آفتابگردان تقلیل می‌دهد (Gunes *et al.*, 2008).

در بررسی انجام شده حاضر محتوای H_2O_2 برگ‌ها (شکل ۱۳) در گیاه تحت تنش خشکی به شدت افزایش یافت و تیمار Si باعث کاهش معنی‌داری در سطوح آن گردید. البته افزایش در میزان H_2O_2 برگ‌ها با توجه به افزایش میزان فعالیت SOD قابل پیش‌بینی بود، اما کاهش سطوح آن در حضور Si احتمالاً حاکی از تاثیر مثبت Si در افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده H_2O_2 به ویژه آنزیم CAT و کاهش اثرات مخرب آن



شکل ۱۳. تغییرات محتوای H_2O_2 در دو رقم مقاوم و نیمه حساس تحت تنش خشکی (D)، سیلیکون - خشکی (Si-D) و کنترل (C). محتوای H_2O_2 تحت تنش خشکی افزایش و تیمار سیلیکون - خشکی آن را کاهش داد.

مقاومت گیاه جو موثر است. با توجه به اینکه بررسی در سطح mRNA توسط semi qRT-PCR انجام شد، بررسی با qRT-PCR نیز جهت دستیابی به نتایج دقیق‌تر پیشنهاد می‌شود. همچنین به منظور دستیابی به نتایج جامع‌تر در خصوص پاسخ گیاهان به تنش خشکی (بویژه در شرایط آب و هوایی مختلف ایران)، بررسی فعالیت سایر آنزیم‌های ضد اکسنده از جمله آنزیم‌های پراکسیداز، گوایکول پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز و اسمولیت‌هایی مانند پرولین و گلاسیسین بتائین در ارقام مورد بررسی و نیز سایر گیاهان زراعی توصیه می‌شود.

بر اساس نتایج این تحقیق سیلیکون با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و کاهش محتوای رادیکال‌های آزاد در سلول، مانع از خسارات اکسنده به سلول‌های گیاهی شد. همچنین تغییرات آنزیم‌های ضد اکسنده و محتوای H_2O_2 ارتباط نزدیکی با یکدیگر داشته و در بروز مقاومت در گیاه تاثیر گذار هستند. رقم مقاوم در مجموع پاسخ بهتری به تنش خشکی و تیمار Si نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش و مستندات منتشر شده توسط سایر محققین می‌توان بیان داشت که Si در تنظیم بیان ژن‌های مسئول پاسخ به تنش در افزایش

REFERENCES

- Aebi HE (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymology. 105: 121-126.
 Agarie S, Uchida H, Agata W, Kubota F, Kaufman PT (1998) Effects of silicon

- on transpiration and leaf conductance in rice plants (*Oryza sativa* L.). Plant Production Science. 1: 89-95.
 Al-Aghabary K, Zhujun Z, 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 DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast. Poly pheol oxide in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24:1-15.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Plant Physiology*. 82:1227-1237.
- Bailey-Serres J, Mittler R. (2006) The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*. 141(2): 311.
- Balakhnina TI, Matichenkov VV, Wodarczyk T, Borkowska A, Nosalewicz M, Fomina IR (2012) Effects of silicon on growth processes and adaptive potential of barley plants under optimal soil watering and flooding. *Plant Growth Regulation*. 67: 35-43.
- Beauchamp C, Fridovich F (1971) Superoxide dismutase: cadmium assay and an assay applicable to acryl amide gels. *Annual Biochemistry*. 44:276-27.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287.
- Beyer W, Imlay J, Fridovich I (1991) Superoxide dismutase progress in nucleic acids. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 40: 221-253.
- Bradford MM (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.
- Epstein E (1999) Silicon. *Plant Physiology*. 50: 641-664.
- Gong HZ, Chen K, Wang S, Zhang C (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Elsevier Science, Shannon, IRLANDE*. 169: 313-321.
- Gunes A, Inal A, Baggi EG, Coban S, Pilbeam DJ (2007) Silicon mediates changes to some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown under B toxicity. *Scientia Horticulturae*. 113: 113-119.
- Gunes A, Pilbeam DJ, Inal A, Coban S (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39: 1885-1903.
- Hammond KE, Evans DE, Hodson MJ (1995) Aluminium/silicon interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant and Soil*. 173: 89-95.
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. Volume II: water, radiation, salt and other stresses, Academic Press, NewYork Lockhart JA.
- Liang Y, Chen Q, Zhang W, Ding R (2003) Exogenous silicon increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in root of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology*. 160: 1157-67.
- Luna CM, Pastori G M, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 56: 417-423.
- Ma JF, Yamaji N (2006) Silicon uptake and accumulation in lower plants. *Trends in Plant Science*. 11: 392-397.
- McCord JM, Keele BB, Fridovich I (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 68: 1024-1027.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. 22: 867-880.
- Nakano Y, Asada K (1983) Purification of ascorbate peroxidase in spinach

- chloroplasts; Its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant & Cell Physiology*. 28: 131-140.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B and ozone- induced of protein biochemical change in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 125-136.
- Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Annual Biochemistry* 167: 290-294.
- Schmidt RE, Zhang X, Chalmers DR (1999) Response of photosynthesis and superoxide dismutase to silica applied to creeping bentgrass grown under two fertility levels. *Journal of Plant Nutrition*. 22: 1763-1773.
- Shahryari R, Mollasadeghi V (2011) Introduction of two principle components for screening of wheat genotypes under end seasonal drought. *Advances in Environmental Biology*. 5: 519-522.
- Sharma P, Dubey RS (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 46: 209-221.
- Shiriga K, Sharma R, Kumar K, Yadav SK, Hossain F, Thirunavukkarasu N (2014) Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene*. 2: 407-417.
- Tale Ahmad S, Haddad R (2011) Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 47: 17-27.
- Yoshimura K, Yabuta Y, Tamoi M, Ishikawa T, Shigeoka S (1999) Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach leaves. *Biochemical Journal*. 338: 41-48.
- Zhu Z, Wei G, Li J, Qian Q, 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.