ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۹
صفحه ۵۸-٤۷

تاثیر سیلیکون در افزایش تحمل به خشکی در مرحله‌ی دو برگی گیاه جو

رحیم حداد*[۱]، زهرا مشیری[۲]

۱و۲- به ترتیب استادیار و کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۵ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

در تحقیق حاضر، اثر ناشی از تنش خشکی در فعالیت برخی آنزیم‌های ضد اکسنده (کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX))، میزان پروتئین محلول کل، میزان کلروفیل، میزان پرولین وگلایسین بتائین در دو رقم گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) با تحمل متفاوت به خشکی با نام‌های کویر (متحمل) و جنوب (حساس)، با به‌کار بردن و یا بدون کاربرد سیلیکون بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و سه تیمار (شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی) اجرا شد. در تجزیه واریانس، تمام اثرات ساده و متقابل عوامل مورد مطالعه به غیر از اثر متقابل رقم و تیمار مربوط به آنزیم پراکسیداز معنی‌دار شد. نتایج نشان دادند که در هر دو رقم، کاربرد سیلیکون فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و اسمولیت‌ها را تحت شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد. میزان کلروفیل و پروتئین محلول کل در هر دو رقم توسط تیمار خشکی به‌شدت کاهش یافت، این کاهش تاحدی توسط تیمار سیلیکون، جبران شد. به طور کلی تمام فعالیت‌های مورد مطالعه برای کلیه‌ی تیمارها در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بالاتر بود. نتایج تحقیق نشان داد که سیلیکون موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده شده تا مقاومت هر دو رقم را در برابر شرایط تنش افزایش دهد. بنابراین سیلیکون می‌تواند در فعالیت‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی گیاهان تحت شرایط تنش درگیر شود.

واژه‌های کلیدی

تنش خشکی،
جو،
سیلیکون،
ضد اکسنده

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی، به شکلی ناسازگار بر روی رشد گیاه و میزان محصول تاثیر گذاشته و لذا مبنای دسته‌ای از تغییرات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان هستند. خشکی، شدت دما و خاک‌های شور، معمول‌ترین تنش-های غیرزیستی هستند که گیاهان با آنها روبرو می‌باشند. این تنش‌ها سبب خسارت اکسیداتیو به اجزای گیاهان می‌شوند. گونه-های اکسیژن فعال[1] (ROS)، با نام‌های آنیون سوپر اکساید (O_2^{-})، هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و اکسیژن منفرد (O_2) در جریان متابولیسم موجودات بی‌هوازی به طور مداوم ساخته می‌شوند (۳۲). برای کاهش خسارت اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله‌ی گونه‌های اکسیژن فعال، گیاهان سیستم‌های دفاعی ضد اکسندگی ایجاد می‌کنند که شامل آنزیم‌های ضد اکسنده مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POX) و ضد اکسنده‌های غیرآنزیمی مانند اسید اسکوربیک، کارتنوئیدها، توکوفرول، گلوتاتیون و ترکیبات فنلیک می‌باشند (۱). از دیگر مکانیزم‌های حفاظتی گیاهان می‌توان به متابولیت‌هایی با وزن مولکولی پایین (محلول‌های سازگار) اشاره کرد. متابولیت‌هایی که به‌عنوان محلول‌های سازگار عمل می‌کنند درگونه‌های گیاهی متفاوت بوده و شامل الکل‌های قندی پلی‌هیدروکسیله، اسیدهای آمینه و مشتقات آن، ترکیبات سولفونیوم سه‌تایی و ترکیبات آمونیوم چهارتایی می‌باشند (۲۷).

سیلیکون، دومین عنصر فراوان در پوسته‌ی زمین است. گیاهان سیلیکون را به طور عمده، به صورت سالیسیلیک اسید ($Si(OH)_4$) جذب می‌کنند. تجمع این عنصر در گیاهان، به طور قابل توجهی از یک درصد تا ۱۰ درصد وزن خشک در گونه‌های مختلف، متفاوت است (۳، ۱۰، ۱۴ و ۲۴). نقش سیلیکون در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در غلات به اثبات رسیده است. گانگ و همکاران (۱۳) اثرات کاربرد سیلیکون قبل از بذرپاشی را روی تنش اکسیداتیو القا شده به وسیله‌ی خشکی و دفاع ضد اکسنده در گندم (*Triticum aestivum*) در مراحل مختلف نموی (بوته‌دهی و پرشدن دانه) بررسی کردند. در تحقیق آنها در اثر خشکی در مرحله‌ی بوته‌دهی، فعالیت سوپراکساید دیسموتاز متوقف شده و فعالیت پراکسیداز افزایش یافت. به کار بردن تیمار سیلیکون تاثیری در فعالیت آنزیم‌های این مرحله نداشت. در مرحله‌ی پرشدن دانه، کاربرد سیلیکون فعالیت SOD را افزایش داده و فعالیت POX را در گیاهان تحت تنش خشکی کاهش داد. در مطالعه‌ای دیگر گانگ و همکارانش (۱۵) اثرات سیلیکون بر روی تغییرات القا شده به وسیله‌ی خشکی در خسارت اکسیداتیو به رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، لیپیدها و فعالیت برخی آنزیم‌ها در گیاهان گندم رشد یافته در گلدان را بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان داد که کاربرد سیلیکون در مقایسه با تیمار شاهد، فعالیت برخی آنزیم‌های ضد اکسنده، اسیدهای چرب اشباع نشده لیپیدها، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول تحت تنش خشکی را افزایش می‌دهد. گلایسین بتائین و پرولین، دو اسمولیت عمده هستند که در گونه-های مختلف گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، دماهای زیاد، پرتو UV و فلزات سنگین تجمع می‌یابند. احتمالا هر دو ترکیب اثرات مثبت بر ساختمان آنزیم‌ها و ساختار غشاء سلولی داشته و در ایجاد تعادل اسمزی در گیاهان رشد یافته تحت شرایط تنش نقش دارند. گلایسین بتائین در پاسخ به تنش در بسیاری از گیاهان زراعی شامل نیشکر، اسفناج، جو، گندم و سورگوم تجمع می‌یابد. اسید آمینه‌ی پرولین به طور وسیعی در گیاهان عالی وجود داشته و به میزان زیادی در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد (۶).

گیاه جو، یکی از غلات مهم و پرمصرف در سراسر جهان است که در تغذیه‌ی انسان، پرندگان و پرورش دام‌ها کاربرد دارد. در این تحقیق اثر سیلیکون بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و اسمولیت‌ها و همچنین میزان پروتئین محلول کل و کلروفیل در دو رقم گیاه جو ایرانی با تحمل متفاوت به خشکی، در شرایط گلخانه بررسی شد.

[1] Reactive Oxygen Species

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

جدول ۱- برخی از خصوصیات مهم زراعی ارقام بکار برده شده در تحقیق

عملکرد (تن/هکتار)	وزن هزار دانه (گرم)	ارتفاع بوته (سانتی متر)	رنگ دانه	مناطق کشت در کشور	وضعیت مقاومت به خشکی	نام رقم
۴/۵ – ۵/۵	۴۱	۹۰	روشن	نواحی مرکزی و جنوب	متحمل	کویر
۵ – ۵/۵	۴۳	۸۵	روشن	نواحی جنوب	حساس	جنوب

مواد و روش‌ها

بذور جو مربوط به یک رقم متحمل به نام "کویر" و یک رقم حساس به نام "جنوب" (جدول ۱) از بخش غلات شهرک تهیه‌ی نهال و بذر کرج و با مشورت کارشناسان آن بخش تهیه گردید. 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 (۲۵±۲ °C) و طول روز تقریبا ۱۰ ساعت بود. آزمایش فاکتوریل با پایه‌ی طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و سه تیمار (شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی (۲ میلی مولار سیلیکات سدیم/ کیلوگرم خاک) صورت گرفت. تنش خشکی با کار گذاشتن بلوک گچی در گلدان‌ها اعمال گردید. نمونه‌برداری در مرحله‌ی دو برگی، زمانی که پتانسیل آب خاک در تیمارهای خشکی و سیلیکون-خشکی به ۱- مگاپاسکال رسید، انجام شد. نمونه‌های یک گرمی از برگ‌های سالم هر بوته برداشت شده و پس از انجماد فوری در نیتروژن مایع در فریزر ۸۰°C- به منظور استفاده در سنجش‌های بعدی نگهداری شد. استخراج پروتئین محلول کل براساس روش تشریح شده حداد و همکاران (۱۶) انجام گرفت. استخراج، با استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدون در حضور ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ و سدیم متابای بی‌سولفیت ۱ میلی‌مولار) صورت گرفته و پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ rpm و دمای ۴°C+ توسط دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Beckman Culter مدل Allegra–64R)، عصاره با ۲۵ درصد حجم از گلیسرول ۵۰ v/v درصد ترکیب و در دمای ۸۰°C- تا زمان مصرف ذخیره گردید.

غلظت پروتئین محلول کل با دستگاه اسپکتروفتومتر (LABOMED، مدل UVD - ۳۲۰۰ ساخت کشور آمریکا) به روش بردفورد (۷) سنجش شد. در این روش، جهت اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های گیاهی، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA)، منحنی استاندارد رسم گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره‌ی آنزیمی با یک میلی‌لیتر معرف بردفورد ۲۰ درصد مخلوط شده و بعد از ۵ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. جهت سنجش ژلی پروتئین محلول کل از ژل SDS-PAGE به روش لاملی (۲۲) استفاده گردید. در این روش از ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۴/۵ درصد استفاده شد. مقدار کلروفیل به روش آرنون و با استفاده از رابطه کلروفیل کل = 20.2×A + 8.02×B برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز، از روش ابی (۲) استفاده گردید. محلول‌هایی که برای سنجش فعالیت ویژه این آنزیم استفاده شد شامل ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۱۵۰۰میکرولیتر 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 روبرتسون و همکاران (۲۹) استفاده گردید. جهت انجام این بخش از آزمایش، ژل بومی جداکننده‌ی

۶ درصد و ژل متراکم کننده‌ی ۴ درصد به کار برده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش چانس و مهلی (۸) به وسیله‌ی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) ۷۰ میلی‌مولار، محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۷۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل شده، ۷۵۰ میکرولیتر گوئیکول ۱۰ میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر استریل بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ٤۷۰ نانومتر و در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. برای سنجش این آنزیم روی ژل از روش هارت و همکاران (۱۷) استفاده گردید. در این روش ژل جدا کننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش اسپکتروفتومتری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، از روش ناکانو و اسدا (۲۵) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲۵۵۰ میکرولیتر آسکوربیت ۰/۵ میلی‌مولار، محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۴۵۰ میکرولیتر پراکسیداز-هیدروژن ۲ میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر استریل بود. فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر و مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه قرائت گردید. به منظور سنجش ژلی این آنزیم از روش رائو و همکاران (۲۸) استفاده شد. در این روش از ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ٤ درصد استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، از طریق توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری ماده شیمیایی نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) به روش دهیندسا و همکاران (۱۰) توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۸) ۵۰ میلی‌مولار، متیونین۱۲ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار می‌باشد. ابتدا به میزان صفر، ۱۵، ۳۰، ٤۵ و ٦۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به‌ترتیب به ۲۷۰۰، ۲٦۸۵، ۲٦۷۰، ۲٦۵۵ و ۲٦٤۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش اضافه و سپس به میزان ۳۰۰ میکرولیتر ریبوفلاوین به غلظت ۱۲μM به هر یک از واکنش‌ها اضافه شده و پس از به هم زدن مخلوط، کیووت‌ها در زیر لامپ فلورسنت W ۱۵ به فاصله ۳۵ سانتیمتری منتقل گردید. پس از ۱۰ دقیقه با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵٦۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس روش بیوشامپ و فریدوویچ (۶) برای الکتروفورز آنزیم سوپراکساید دیسموتاز از ژل جداکننده‌ی ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده‌ی ۴ درصد استفاده گردید. برای استخراج پرولین از روش ناین هیدرین اسید استفاده شد (۳۵). مخلوط واکنش شامل ۱۰ ml سولفو سالیسیلیک اسید ۳ درصد، ۲ ml اسید ناین هیدرین، ۲ ml اسیداستیک گلاسیال، ٤ ml تولوئن بود. غلظت نمونه‌های پرولین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر، پس از رسم منحنی استاندارد قرائت شد. روش استخراج گلایسین بتائین در این آزمایش، روش گریو و گراتان (۱۵) بود. مخلوط واکنش شامل ۱۰ ml آب مقطر، ۱ ml اسید سولفوریک ۲ مولار، ۰/۲ ml یدید پتاسیم، ۹ ml ماده ۱ و ۲- دی کلرو اتان می‌باشد. پس از رسم منحنی استاندارد، میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳٦۵ نانومتر قرائت شد.

بررسی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و برنامه MSTATC انجام گرفته و میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال مربوطه با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در برخی از منابع پیشنهاد شده است که سیلیکون می‌تواند تحمل به خشکی را در گیاهان افزایش دهد. به منظور روشن‌تر شدن اثر این عنصر، در این تحقیق اثرات سیلیکون بر تنش خشکی در دو رقم گیاه جو ایرانی بررسی شد. مشخص شده است که در شرایط رشد طبیعی، در تعداد زیادی از فرایندهای متابولیکی، گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهان تولید می‌شوند (۳٤). اما گیاهان دارای سیستم‌های ضد اکسنده‌ی موثری برای حذف ROS هستند (۳۴ و ۳۵). سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) مهم-ترین آنزیم‌های ضد اکسنده قلمداد می‌گردند (۱۵ و ۲۴).

در این تحقیق، اثر تیمار، رقم و اثر متقابل رقم × تیمار برای صفات اندازه گیری شده (آنزیم‌های ضد اکسنده‌ی کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز، کلروفیل، پروتئین، پرولین و گلایسین بتائین) مورد بررسی قرار گرفت. تمام اثرات ساده و متقابل مورد بررسی، به استثنای اثر متقابل رقم × تیمار مربوط به آنزیم پراکسیداز، معنی‌دار شدند (جدول ۲). میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال یک

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

درصد باهم مقایسه گردیدند. در هر دو رقم مقاوم و حساس، تیمارهای مورد بررسی در گروه‌های آماری متفاوت قرار گرفتند.

در این تحقیق از تمام تیمارها به میزان ثابتی استخراج پروتئین کل صورت گرفت (یک گرم نمونه برگ و ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج). لذا با ریختن حجم ثابتی از نمونه‌های مورد بررسی (۷ میکرولیتر در هر چاهک) چگونگی تغییرات باندها بر اثر تاثیر هر تیمار مطالعه گردید. در این مطالعات مشاهده شد که در هر دو رقم مقاوم و حساس، تیمار خشکی سبب کاهش میزان پروتئین می‌شود که این کاهش توسط به کار بردن سیلیکون به طور قابل توجهی جبران گردید (شکل ۱). کاهش میزان پروتئین در نتیجه تنش، احتمالا به دلیل افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال است که به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله پروتئین‌ها خسارت وارد می‌کند. نتایج مشابه توسط گانگ و همکاران (۱۵) و طالع احمد و حداد (۱) به‌دست آمده است. این نتایج پیشنهاد می‌کند که کاربرد سیلیکون می‌تواند خسارت اکسیداتیو به گیاهان تحت تنش خشکی را کاهش داده و در نتیجه در تحمل به تنش، نقش داشته باشد. تنش شوری نیز می‌تواند میزان پروتئین را تغییر دهد. واقعیت قابل توجه این است که این تغییرات در اندام‌های مختلف گیاهی ممکن است متفاوت باشد. بیشتر محققین تشخیص داده‌اند که میزان پروتئین محلول کل در ریشه‌ها تحت تنش کاهش می‌یابد (۲۰). گاپینسکا و همکاران (۱۲) اثر شوری کوتاه‌مدت و بلندمدت و همچنین شوری متوسط و شدید را در ریشه‌های گوجه‌فرنگی بررسی کرده و دریافتند که غلظت پروتئین از لحاظ آماری در طول آزمایش ثابت می‌باشد. زو و همکاران (۳۷) در بررسی اثرات سیلیکون خارجی بر روی تغییرات ناشی از تنش شوری در برگ‌های خیار، مشاهده کردند که تنش شوری به طور معنی‌داری میزان پروتئین محلول برگ را کاهش می‌دهد، در حالی که سیلیکون مقدار پروتئین برگ گیاهان تنش‌دیده را افزایش داد. از آنجا که تنش اکسیداتیو سبب تخریب پروتئین می‌شود، می‌توان گفت که سیلیکون در مقابله با تنش اکسیداتیو مؤثر است.

در تحقیق حاضر در هر دو رقم موردمطالعه، تیمار خشکی سبب کاهش میزان کلروفیل شد که این کاهش به طور معنی‌داری به واسطه تیمار سیلیکون جبران گردید. همچنین مشاهده شد که میزان کلروفیل در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بیشتر است (شکل ۲). تأثیر تنش در کاهش میزان کلروفیل در برخی مطالعات گزارش شده است (۳، ۱۴ و ۳۵). کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌تواند مربوط به فتواکسیداسیون کلروفیل توسط گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز، انتقال مجدد نیتروژن از برگ به دانه و همچنین تغییر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم نیتروژن مانند نیترات ریدوکتاز باشد (۲۱). کاهش کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌تواند جنبه‌ی سازگاری نیز داشته باشد، زیرا غلظت بالای کلروفیل برگ می‌تواند یک منبع بالقوه برای تولید گونه‌های اکسیژن فعال محسوب گردد و لذا کاهش کلروفیل در این شرایط باعث کاهش خسارت به سیستم فتوسنتزی بر اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۲۲).

سیستم‌های دفاعی ضداکسنده آنزیمی گیاهان، برای کاهش خسارت اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال، شامل آنزیم‌های ضد اکسنده مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گوئیکول پراکسیداز (GR) می‌باشد. SOD یک حذف‌کننده‌ی اصلی سوپراکسید است و فعالیت آنزیمی آن منجر به تشکیل H_2O_2 و O_2 میشود. H_2O_2 تولید شده سپس به وسیله‌ی کاتالاز و انواع مختلف پراکسیدازها حذف می‌شود (۳ و ۲۷). فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده در این تحقیق توسط تیمار خشکی افزایش یافته و اضافه کردن سیلیکون فعالیت این آنزیم‌ها را شدت بخشید. برای فعالیت آنزیم‌های SOD و POX هر یک دو باند آنزیمی تشخیص داده شد (شکل ۴ و ۵) که در شرایط تنش سیلیکون و خشکی تمایز دو باند آشکارتر بود. اکثر نتایج حاصل از اندازه‌گیری با دستگاه اسپکتروفتومتر با نتایج حاصل از ژل انطباق داشت (اشکال ۳ تا ۶). مشابه با این نتایج توسط لیانگ و همکاران (۲۴) در گیاه جو، زو و همکاران (۳۷) در گیاه خیار و آقاباری و همکاران (۴) در گیاه گوجه‌فرنگی، که همه‌ی گیاهان تحت تنش شوری بوده‌اند و نیز امینی و همکاران (۲) در گیاه جو تحت تنش خشکی گزارش شده است. گانگ و همکاران (۱۴) مشاهده کردند که اضافه کردن سیلیکون فعالیت SOD و CAT را در گیاه گندم

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد. این محققین در تحقیقات دیگری در گندم (۱۳) مشاهده کردند که در شرایط آبیاری مناسب، فعالیت SOD و APX با مصرف سیلیکون تغییر نمی‌کند، در حالی که فعالیت دو آنزیم دیگر POX و CAT کاهش می‌یابد. بنابراین در بیشتر موارد، میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در برابر تنش‌های غیرزیستی، افزایش یافته و این آنزیم‌ها با حذف گونه‌های اکسیژن فعال به صورت مستقیم یا باواسطه (مانند گوئیکول و NADPH)، بافت‌های گیاهی را در برابر تنش محافظت می‌کنند. بنابراین سیلیکون با تحریک افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط تنش، سبب حفاظت بیشتر سلول و بافت‌ها و افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌های اکسنده می‌گردد.

درتحقیق حاضر، میزان تغییرات پرولین و گلایسین بتائین، به‌عنوان دو اسمولیت شاخص، در تیمارهای شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی به‌منظور آشکار شدن تأثیر تیمار سیلیکون نسبت به تیمار بدون سیلیکون بررسی شد. میزان پرولین و گلایسین بتائین، در اثر تیمار خشکی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و تیمار سیلیکون-خشکی نیز سبب افزایش معنی‌دار میزان این اسمولیت‌ها در مقایسه با تیمار خشکی گردید. همچنین مشاهده شد که میزان پرولین و گلایسین بتائین در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس بالاتر است (اشکال ۷ و ۸). یکی از معمول‌ترین پاسخ‌های تنش در گیاهان، تولید بیش از حد انواع محلول‌های آلی سازگار است. این محلول‌های سازگار، گیاه را در مقابل تنش از طرق مختلف شامل شرکت در تعادل اسمزی سلولی، سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال، حفاظت از تمامیت غشاء و تثبیت پروتئین‌ها/ آنزیم‌ها محافظت می‌کنند. گلایسین بتائین در پاسخ به تنش در بسیاری از گیاهان زراعی شامل نیشکر، اسفناج، جو، گندم و سورگوم تجمع می‌یابد (۳۳). در این گونه‌ها، ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به ژنوتیپ‌های حساس، در پاسخ به تنش، به طور طبیعی میزان بیشتری گلایسین بتائین جذب می‌کنند که با نتایج تحقیق حاضر منطبق است. در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی تجمع پرولین با تحمل به تنش همبستگی داشته و به طور عمومی غلظت آن در گیاه متحمل به تنش نسبت به گیاهان حساس، بالاتر بوده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. برای مثال، درحالی که غلظت پرولین گیاهان یونجه‌ی متحمل به شوری در ریشه، تحت شرایط تنش به سرعت دو برابر می‌شود، پاسخ‌گویی در گیاهان حساس به شوری آهسته‌تر است (۲۸). لیانگ و همکاران (۲۵)، در تحقیقی نقش سیلیکون در افزایش تحمل به تنش یخ-زدگی (۵- °C) در دو رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) را بررسی کردند. غلظت پرولین آزاد به‌وسیله تنش یخ‌زدگی در هر دو رقم گندم به طور فزاینده‌ای افزایش یافت، اما با اضافه کردن سیلیکون، میزان پرولین به طور معنی‌داری فروکش کرد. آنها نتیجه گرفتند که سیلیکون با کاهش تجمع پرولین در راستای کاهش تنش اکسنده‌ها عمل کرده است. تجمع پرولین در گیاهان قرار گرفته در معرض تنش خشکی نیز اتفاق می‌افتد. برای مثال در گیاهان برنج که در معرض کمبود آب قرار می‌گیرند، غلظت پرولین در برگ‌ها افزایش می‌یابد (۱۹). نقش پرولین در هنگام تنش، جلوگیری ازتخریب آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه‌ی ماکرومولکول‌ها، دخالت در حفظ استحکام دیواره‌ی سلولی و پاکسازی هیدروکسیل‌های تولیدی تحت تنش در گیاه است. به نظر می‌رسد سیلیکون با افزایش میزان پرولین این وظایف را شدت بخشیده و به افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش کمک می‌کند (۳۱). در این تحقیق، همچنین درصد همبستگی صفات اندازه‌گیری شده با سایر صفات به تفکیک تیمارهای اعمال شده (شاهد، خشکی و سیلیکون-خشکی) برای میانگین رقم مقاوم و حساس بررسی شد (جدول ۲). مشخص شد که به‌طور کلی میزان همبستگی کلروفیل کل، پروتئین و آنزیم سوپراکساید دیسموتاز با سایر صفات بیشتر می‌باشد. همچنین ملاحظه گردید که تیمار خشکی بالاترین میزان همبستگی صفات را دارا می‌باشد که می-تواند به دلیل تولید زیاد گونه‌های اکسیژن فعال که سبب تحریک سیستم دفاعی ضد اکسنده و اسمولیت‌ها می‌گردد، باشد. این که چرا میزان همبستگی در تیمار سیلیکون-خشکی کاهش می‌یابد، احتمالا به دلیل اثر سیلیکون می‌باشد که خسارت اکسنده را کاهش داده و در نتیجه از تحریک سیستم دفاعی کاسته می‌شود. همچنین میزان آنزیم SOD که همسو با سایر صفات افزایش می-یابد، شاید به این دلیل باشد که این آنزیم اولین خط دفاعی سلول بر علیه گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد و افزایش بیان آن برای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

محافظت از سلول در برابر تنش‌های اکسنده ضروری است (۲۷). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که سیلیکون می‌تواند در بهبود تحمل گیاهان جو ایرانی نسبت به تنش خشکی نقش داشته باشد که با افزایش توانایی دفاع ضد اکسندگی و کاهش خسارت به ماکرو مولکول‌هایی چون پروتئین‌ها مرتبط است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که اثرات این عنصر در سایر مراحل رویشی و زایشی گیاه نیز مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت اثبات نقش مثبت سیلیکون در افزایش تحمل به تنش در تمام مراحل رشد گیاه، بتوان از این عنصر در شرایط مزرعه و در راستای رسیدن به محصول بیشتر و کاهش خسارت به محصولات در مناطق خشک استفاده نمود. از طرف دیگر بررسی فعالیت سیستم‌های ضداکسنده غیر آنزیمی در این تحقیق بررسی نگردیده است و احتمال دارد با افزایش فعالیت آنزیمی ضد اکسنده‌های مورد مطالعه، سلول گیاه فعالیت سیستم‌های ضداکسنده غیر آنزیمی را کاهش داده باشد. جهت اطلاع از این امر، بررسی مورد یاد شده در ادامه تحقیق توصیه می‌گردد. از آنجایی که هدف این تحقیق همانند برخی پژوهش‌های مشابه، بررسی اثر سیلیکون در شرایط تنش خشکی بود، لذا این عنصر به تنهایی مورد مطالعه قرار نگرفت. انجام چنین مطالعه‌ای قابل ذکر است. همچنین پیشنهاد می‌گردد که با به کار بردن مقادیر متفاوت از این عنصر، موثرترین میزان مورد نیاز در شرایط مزرعه مطالعه شده و بتوان از این عنصر برای تولید محصول بیشتر در شرایط تنش استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از بخش غلات شهرک اصلاح و تهیه‌ی نهال و بذر کرج به علت در اختیار گذاشتن بذور تشکر می‌گردد.

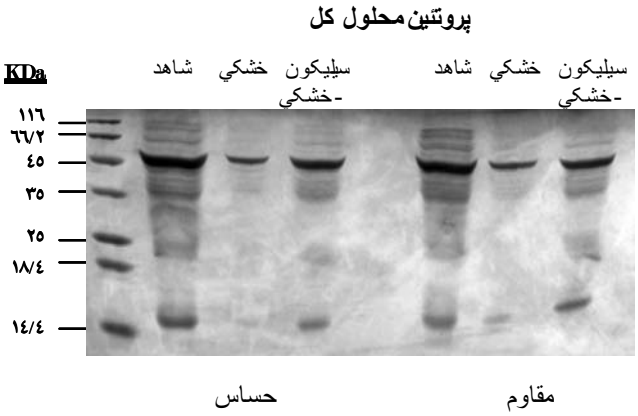
جدول۲- میانگین مربعات صفات مورد بررسی در آزمایش

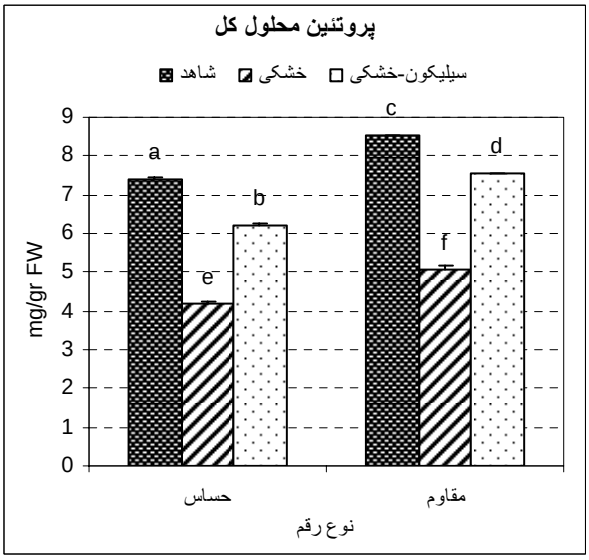
منبع	درجه آزادی	CAT	SOD	POX	APX	Protein	کلروفیل کل	پرولین	گلایسین بتائین
رقم	۱	۰/۱۲۳**	۷/۸۵**	۰/٤۸**	۹/۵۱**	۵/۳**	۰/۹۱۱**	۲۲۱/۲**	۱۰۹۵/۲۹**
تیمار	۲	٦/٦۷**	٦۰٦/۵۵**	۱۷/۵۹**	۵۸/٤**	۱٦/۹۲**	۲/۲۲**	۲۱٤۸۱/۳**	٤۱۹٦٦/۸۹**
رقم× تیمار	۲	۰/۰۰۱*	۹/۸٤**	۰/۰۲٤n.s	۱/٤**	۰/۰۹**	۰/۰۰٦*	۹٤/۳۲**	۵۵۱/٤٦**
خطا	۱۲	۰/۰۰۰۱	۰/۱٦۲	۰/۰۲٤	۰/۰٦۹	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	٤/۱۱	۳۳/۳۱
CV		۰/۲۷	۱/٦۹	۲/۷	۳/۵	۰/٦۹	۰/۸۱	۱/٤۱	۳/۳۹

جدول۳- مجموع درصد همبستگی بین صفات انداز گیری شده در این آزمایش

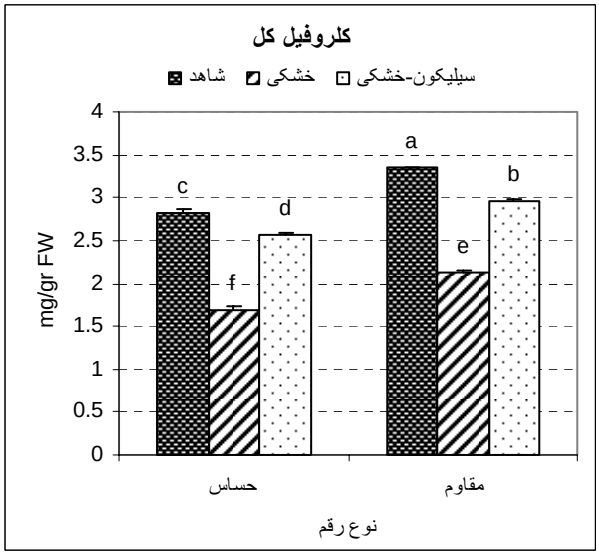
صفت \ تیمار	شاهد	خشکی	سیلیکون + خشکی	جمع کل
گلایسین بتائین	۰	۷۱	۵۷	۱۲۸
پرولین	۰	۱۰۰	۵۷	۱۵۷
کلروفیل کل	۵۷	۱۰۰	۷۱	۲۲۸
پروتئین	۵۷	۱۰۰	۷۱	۲۲۸
APX	۲۹	۱۰۰	۱۴	۱۴۳
POX	۵۷	۸۶	۰	۱۴۳
SOD	۷۱	۸۶	۵۷	۲۱۴
CAT	۷۱	۱۰۰	۷۱	۲۴۲
جمع کل	۳۴۲	۷۴۳	۳۹۸	۱۴۸۳

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]



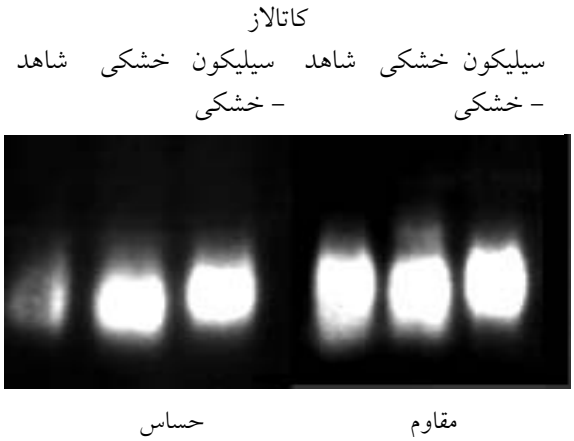


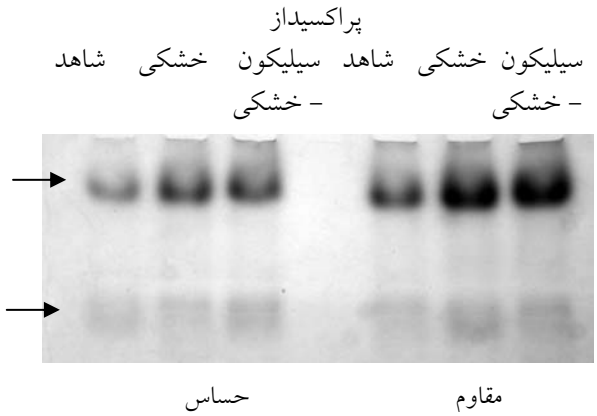
شکل۱- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان پروتئین محلول کل بر روی ژل Native PAGE و به صورت نمودار به تفکیک ارقام مقاوم و حساس. برای مشاهده باندها در هر چاهک ژل ۷ میکرولیتر عصاره پروتئین بارگیری شده است.

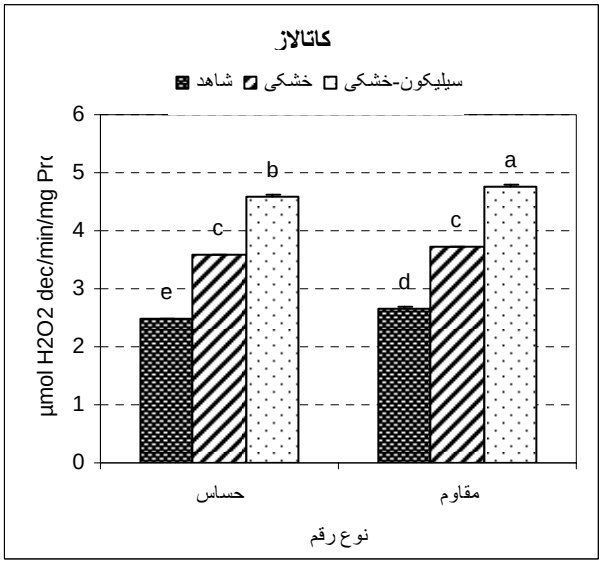


شکل ۲- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان کلروفیل به تفکیک ارقام مقاوم و حساس.

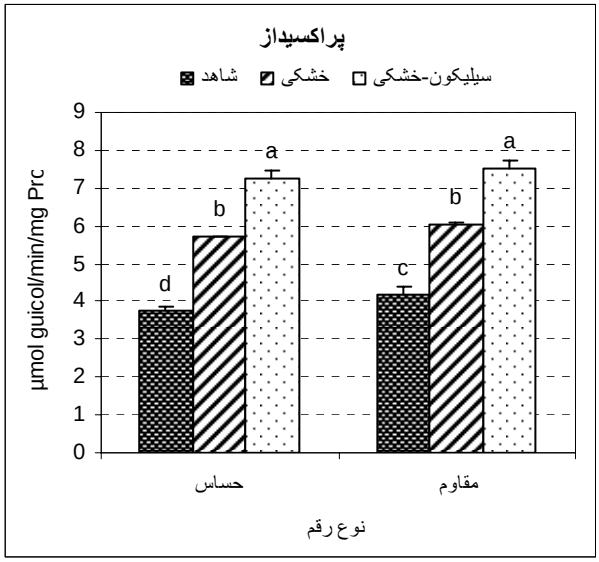
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]





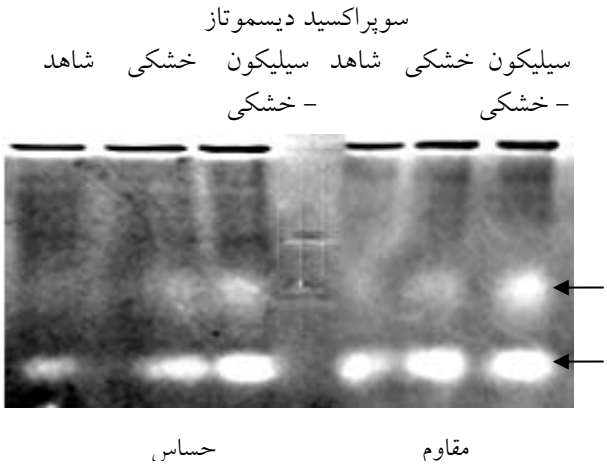


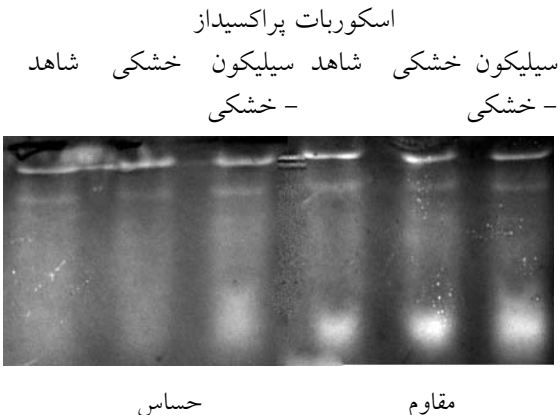
شکل۳- تاثیر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنـزیم کاتـالاز بـر روی ژل Native PAGE و بـه صـورت نمـودار بـه تفکیک ارقام مقاوم و حساس. برای مشاهده فعالیت آنزیم کاتالاز در هر چاهک ژل ۲۵ میکروگرم عصـاره پـروتئین بارگیری شده است.

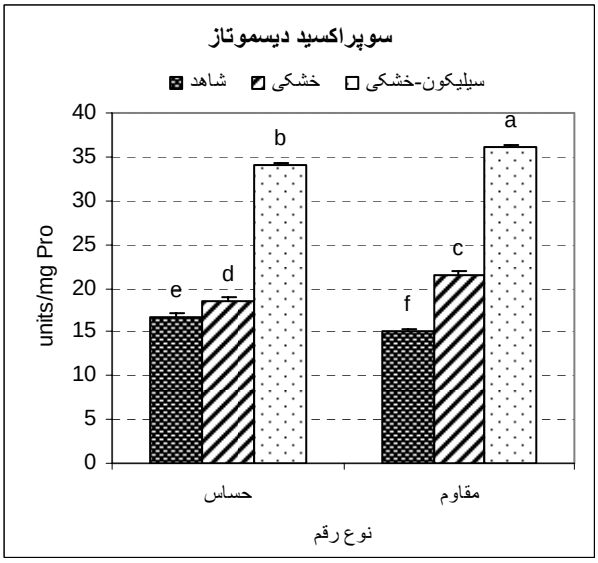


شکل۴- تاثیر تیمارهای مختلف بـر میـزان فعالیـت آنـزیم پراکسیداز بر روی ژل Native PAGE و به صورت نمودار به تفکیک ارقام مقاوم و حسـاس. بـرای مشـاهده فعالیـت آنزیم پراکسیداز در هر چاهک ژل ۴۰ میکروگـرم عصـاره پروتئین بارگیری شده است.

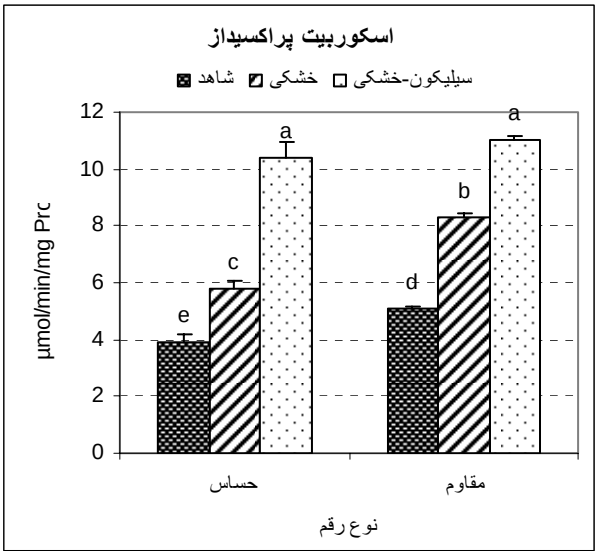
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]





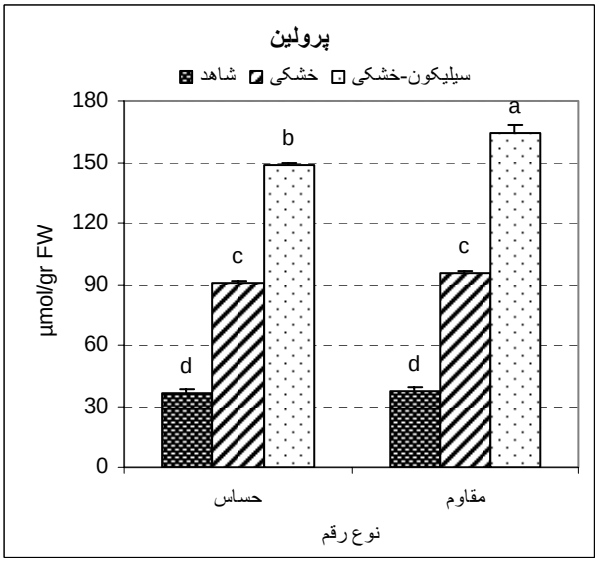


شکل ۵- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بر روی ژل Native PAGE و به صورت نمودار به تفکیک ارقام مقاوم و حساس. برای مشاهده فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر چاهک ژل ۵۰ میکروگرم عصاره پروتئین بارگیری شده است.

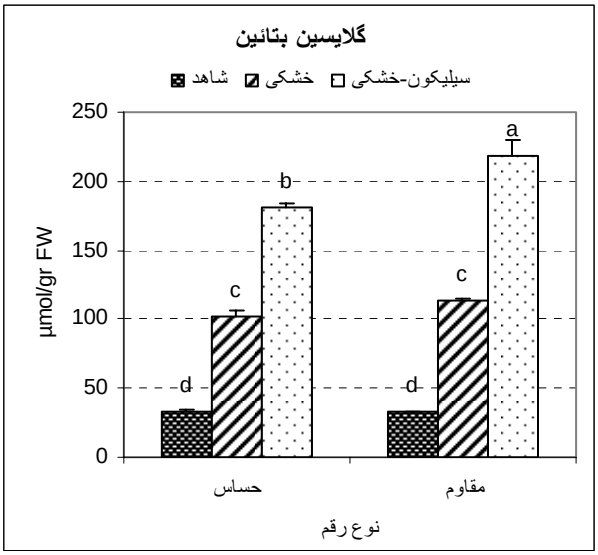


شکل ٦- تا ثیر تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر روی ژل Native PAGE و به صورت نمودار به تفکیک ارقام مقاوم و حساس. برای مشاهده فعالیت آنزیم اسکوربیت پراکسیداز در هر چاهک ژل ۴۰ میکروگرم عصاره پروتئین بارگیری شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]



شکل۷- تاثیر تیمارهـای مختلـف بـر میـزان پـرولین بـه تفکیک ارقام مقاوم و حساس.



شکل ۸- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان گلایسین بتائین به تفکیک ارقام مقاوم و حساس.

منابع

۱. طالع احمد س، حداد ر، (۱۳۸۶) مطالعه اثرات سیلیکون در ارقام گندم تحت تنش خشکی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی (ره) قزوین.

۲. امینی ز، حدّاد ر، مرادی ف، (۱۳۸۷) بررسی اثر تنش کم آبی بر نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در مراحل رشد زایشی گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.)، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ویژه نامه علوم و فنون گیاهی، سال دوازدهم، شماره ٤٦ (الف)، ٧٦- ٦٥.

3. Aebi H E (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121–126.

4. Al–Aghabary K, Zhu Z, Shi Q H (2004) Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. Journal of Plant Nutrition, 27: 2101–2115.

5. Arnon D I (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenol oxide in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1–15.

6. Ashraf M, Foolad M R (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environment and Experimental Botany, 59: 206–216.

7. Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase, improved assays and assay applicable to acrylamide gel. Anal Biochem, 44: 276–287.

8. 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.

9. Chance B, Maehly A C (1955) Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, **2**: 764–817.

10. Da Cuhna K P V, Do Nascimento C W A (2008) Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.). Grown on a cadmium and zinc enriched soil. Water Air Soil Pollution: 9814–9.

11. Dhindsa R A, Plumb – Dhindsa P, Thorpe T A (1981) Leaf Senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 126: 93–101.

12. Gapinska M, Sklodowska M, Gabara B (2008) Effect of short –and long –term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiology Plantarum, 30: 11–18.

13. Gong H J, Chen K M, Zhao Z G, Chen G C, Zhou W J (2008) Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages. Biologia Plantarum, 52(3): 592–596.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]

14. Gong H, Chen K, Chen G, Wang S, Zhang C (2003) Effects of silicon on growth of wheat under drought. Journal of Plant Nutrition, 26: 1055–1063.

15. Gong H, Zhu X, Chen K, Suomin W, Zhang C H (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. Plant Science, 169: 313–321.

16. Grieve C M, Grattan S R (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant Soil, 70: 303–307.

17. Haddad R, Morris K, Buchanan–Wolaston V (2004) Expression analysis of two senescence involved genes in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Agriculture Science and Technology, 6:63–72.

18. Hart M A, Tyson H, Bloomberg B (1971) Measurement of activity of peroxidase isoenzymes in flax. Canadian Journal of Botany, 49:2129–2137.

19. Hsu S Y, Hsu Y T, Kao C H (2003) The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. Biology of Plant, 46: 73-78.

20. Jiang L, Duan L, Tian X, Wang B, Zhang H, Zhang M, Li Z (2006) NaCl salinity stress decreased *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. Environmental and Experimental Botany, 55: 315–320.

21. Jiang Y, Huang B (2001) Drought and heat stress injury to two cool–season turfgrass in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science, 41: 436–442.

22. Kranner I, Beckett P R, Wornik S, Zorn M, Pfeifhofer H W (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. Plant Journal, 31: 13–

23. Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 277: 680–685.

24. Liang Y C, Chen Q, Lui Q, Zhang W, Ding R (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt–stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Plant Physiology, 160: 1157–1164.

25. Liang Y C, Zhu J, Li Z, Chu G, Ding Y, Zhang J, Sun W (2008) Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. Environmental and Experimental Botany, 64: 286-294.

26. Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast; in inactivation in ascorbate – depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology, 28: 131–140.

27. Neto A D A, Prisco J T, Eneas–Filho J, Abreu C E B, Gomes–Filho E (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt–tolerant and salt–sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 87–94.

28. Petrusa L M, Winicov I (1997) Proline status in salt tolerance and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. Plant Physiology Biochemical, 35: 303–310.

29. Rao M V, Paliyath G, Ormord D P (1996) Ultraviolet–B and ozone–induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 110:125–136.

30. Robertson E F, Dannelly H K, Malloy P J, Rceves H C (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Annual Biochem, 167: 290–294.

31. Schobert B, Tschesche H (1978) Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. Biochim. Biophys. Acta. 549: 270–277.

32. Semchuk N M, Lushchak OV, Falk J, Krupinska K, Lushckak V I (2009) Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 384–390.

33. Serraj R, Sinclair T R (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought condition?. Plant Cell Environmental, 25:333–341.

34. Sudhakar C, Lakshmi A, Giri D (2001) Changes in the antioxidant enzyme activity in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161: 613 – 619.

35. Tonau G, Molassiotis A, Diamantidis G (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic death – like destruction in strawberry leaves by salinity. Environmental and Experimental Botany, 65: 270–281.

36. Troll W, Lindsley J (1995) A photometric method for the determination of proline. Biological Chemistry, 215:655–660.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.8.5]