

اثر کمبود روی خاک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گندم نان

سید محسن نیازخانی^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، مراد جعفری^۳ و میرحسن رسولی صدقیانی^۴

(۱) دانشآموخته دکتری اصلاح نباتات، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(۲ و ۳) دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

(۴) استاد گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: b.abdollahi@urmia.ac.ir

این مقاله مستخرج از رساله دکتری می‌باشد.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۲

چکیده

به منظور بررسی واکنش ارقام روی-کارا و روی-ناکارا گندم نان به کمبود روی (Zn) خاک، این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل سطح روی در دو شرایط روی کافی (پنج میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک) و عدم مصرف روی، ارقام روی-کارا (بیات و نیکنژاد) و روی-ناکارا (هیرمند و کرج ۱)، بافت (ربشه و برگ) و مرحله رشدی (۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی و ۳۰ درصد سنبله‌دهی به ترتیب تحت عنوان مراحل رویشی و زایشی) بود. در این تحقیق فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز و مقدار مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن، پرولین، ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانت کل اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثرات اصلی و برهمکنش نشان داد تحت شرایط کمبود روی، میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و فنیل - آلانین آمونیالیاز افزایش و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به طور معنی‌داری ($P = 0.01$) کاهش یافت. میزان مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن، فنل و پرولین تحت شرایط کمبود روی به طور معنی‌داری ($P = 0.01$) افزایش یافت. همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و مقدار پرولین در ارقام روی-کارا و مقدار مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در این ارقام کمترین مقدار را دارا بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم روی-کارا بیشتر از سایر ارقام بود. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت شرایط کمبود روی در گندم نان افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: گندم نان، کاتالاز، پرولین و کمبود روی.

مقدمه

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* L. از تیره غلات (Poaceae)، مهم‌ترین گیاه زراعی یک‌ساله بوده و وسیع‌ترین سطح زیرکشت دیم را در جهان دارد. گندم قسمت اعظم پروتئین، املح و ویتامین‌های گروه B و بیش از ۴۰ درصد کالری و ۵۰ درصد پروتئین مورد نیاز جمعیت ایران را تأمین می‌کند (حلیم و همکاران، ۱۳۹۶). این گیاه یک منبع غذایی پایدار برای جمعیت در حال رشد جهان به‌شمار می‌رود و با این‌که ایران یک درصد جمعیت جهان را دارد اما ۲/۵ درصد گندم جهان را مصرف می‌کند (Bahari *et al.*, 2013). گندم نیز همانند سایر گیاهان زراعی در طول دوره زیستی خود با محدودیت‌های محیطی متعددی مانند کمبود عناصر روی (Zn) و آهن مواجه می‌شود. این عناصر کم‌صرف، سوخت و ساز مواد غذایی را در بدن تنظیم می‌کنند و کمبود آن‌ها، سلامت جوامع را به خطر می‌اندازد (Cole *et al.*, 2010). از طرفی سوء‌تغذیه به‌واسطه عناصر کم‌صرف که اغلب از آن به عنوان گرسنگی پنهان یاد می‌شود، بیش از دو میلیارد نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار داده است. این امر به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه که در آن‌ها رژیم غذایی اغلب به صورت گیاه‌خواری است یک مشکل عمده می‌باشد. در بین عناصر کم‌صرف، کمبود روی مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی بوده و تقریباً نصف خاک‌های زیر کشت غلات در دنیا به‌ویژه خاک‌های آهکی مناطق خشک و نیمه‌خشک دچار کمبود روی هستند (Cakmak *et al.*, 2002). به خاطر این‌که درصد بالایی از غذاهای تشکیل‌دهنده رژیم غذایی جمعیت جهان را غلات دارای کمبود روی تشکیل می‌دهند، کمبود این عنصر شیوع گسترده‌ای در جوامع انسانی دارد. در انسان کمبود روی باعث عقب‌افتدگی رشد و کاهش در پاسخ ایمنی همراه است. همچنین بذور با مقادیر بالاتر این عنصر، دارای قدرت جوانه‌زنی بیش‌تر بوده و سیستم ریشه‌ای بزرگ‌تری داشته و عملکرد بالاتری در خاک‌های فقیر از عناصر کم‌صرف تولید می‌کنند (Wissuwa *et al.*, 2006). کمبود روی علاوه بر کاهش کیفیت دانه، موجب کاهش عملکرد آن نیز می‌شود (Haydon and Cobbett, 2007). عنصر روی برای رشد و متابولیسم گیاهی ضروری بوده (Cakmak, 2008) و کمبود روی باعث کاهش استحکام غشای سلولی، حساسیت به تنش گرما و کاهش سنتز کربوهیدرات‌ها در گیاه می‌شود (Singh *et al.*, 2005). در گیاهان، روی یک جزء ضروری برای بیش از ۳۰۰ آنزیم از جمله، RNA پلی‌مراز^۱، آکالالین فسفاتاز^۲، الكل‌دھیدروژناز^۳ و کربنیک آنھیدراز^۴ می‌باشد (Li *et al.*, 2013). بعضی از ژنوتیپ‌ها در خاک‌های دارای کمبود روی، ظرفیت رشد و تولید محصول خوبی دارند. ژنوتیپ‌هایی که متحمل به خاک‌های

1- RNA polymerase

2- Alkaline phosphatase (ALP)

3- Alcohol dehydrogenase (ADH)

4- Carbonic anhydrase (CA)

دارای کمبود روی هستند، اصطلاحاً روی-کارا^۱ نامیده می‌شوند (Pearson and Rengel, 1997). تنش‌های زنده و غیرزنده که به گیاهان آسیب می‌رسانند منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و نهایتاً تنش اکسیدانتیو در گیاه می‌شوند. به‌طورکلی، انواع اکسیژن فعال یا واسطه‌های آن در توسعه سیستم‌های پاسخ گیاهان و جانوران نقش مهمی دارند (Bestwick *et al.*, 1998). تنش اکسیدانتیو در صورت شدید بودن باعث پراکسید شدن ترکیبات غشای سلول، از بین رفتن پلی‌ساکاریدها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و پارگی رشته‌های DNA و RNA می‌شود. انواع گونه‌های فعال اکسیژن^۲، با آسیب رساندن به کلروپلاست برگ، موجب زردی و پیری برگ می‌شوند. در سلول‌های گیاهی معمولاً فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در مواجهه با تنش‌های محیطی افزایش یافته و از این طریق گیاهان قادرند از خسارت‌های ایجاد شده گونه‌های فعال اکسیژن بکاهند. سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز، از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند که در متابولیزه کردن ترکیبات اکسیژن فعال و جلوگیری از خسارت ناشی از تنش‌های اکسیدانتیو نقش اساسی بر عهده دارند (Nikitaki *et al.*, 2015). چون روی به‌طور مستقیم در پروسه‌های بیان ژن و سنتز پروتئین درگیر است چنین به‌نظر می‌رسد که ممکن است تنش کمبود روی باعث مهار فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شود که مانع از آسیب آنتی‌اکسیدانتی گستره و مؤثر به چربی‌های غشایی، پروتئین‌ها، کلروفیل و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Cakmak, 2000). از طرفی آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز اوّلین و کلیدی‌ترین آنزیم مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها می‌باشد (Brooks *et al.*, 2005). بیش‌تر ترکیبات فنلی (شامل لیگنین‌ها و لیگان‌ها) که در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی نقش دارند از مسیر فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند. این ترکیبات در گیاهان نقش‌های مهمی چون حفاظت در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده، سیگنال‌های بین سلولی، محافظت در برابر نور و بهویژه اشعة ماوراء بنفش (UV) و همچنین حفاظت‌های مکانیکی را به‌عهده دارند. بنابراین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده تغییر می‌کند و انتظار می‌رود افزایش فعالیت این آنزیم سبب افزایش تولید مواد فنیل پروپانوئیدی گردد (Bagal *et al.*, 2012). پیش از این کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ارقام روی-ناکارا در شرایط کمبود روی در گیاهانی مانند برجسته (Chen *et al.*, 2009)، خود فرنگی (Hacisalihoglu *et al.*, 2003) و گندم (Pandey *et al.*, 2012) گزارش شده است. با این حال مطالعه جامعی روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و فاکتورهای بیوشیمیایی در ارقام روی-کارا و روی-ناکارای گندم نان در شرایط کمبود روی در ریشه و برگ انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر کمبود روی خاک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و صفات بیوشیمیایی در ریشه و برگ در مراحل مختلف رشد، در ارقام روی-کارا و روی-ناکارای گندم نان بود.

1- Zn-efficient

2- Reactive oxygen species (ROS)

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی ارومیه در بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ اجرا گردید. آزمایش، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول شامل کاربرد عنصر روی در دو مقدار عدم مصرف روی (کمبود روی) و پنج میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک (روی کافی) از منبع سولفات روی، عامل دوم ارقام گندم شامل بیات و نیکنژاد (روی - کارا) و هیرمند و کرج ۱ (روی - ناکارا) (باغبان طبیعت و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۱؛ Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2009) عامل سوم بافت مورد نمونه‌برداری (ریشه و برگ) و عامل چهارم نمونه‌برداری در دو مرحله رشدی ۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زايشی) بود. خاک شنی مورد استفاده (جدول ۱) از بستر رودخانه فصلی خان آرخی واقع در شمال غربی دانشگاه ارومیه تهیه گردید.

جدول ۱: مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک شنی مورد استفاده در آزمایش

شوری (میلی‌موس بر سانتی‌متر)	آهک (درصد)	اسیدیته (درصد)	ماده آلی (درصد)	نیتروژن (درصد)	پتاسیم (درصد)	رس (درصد)	شن (درصد)	سیلت (درصد)
۱/۱۹	۷/۸	۰/۶۹	۰/۰۶	۹/۴	۲/۴	۰/۱۵	۳	۱

خاک بعد از غربال با الک دو میلی‌متری، پنج بار با آب معمولی کاملاً آب‌شویی شده و درنهایت با آب دو بار تقطیر آب-کشی گردید. بعد از آب‌شویی و هوا خشک شدن خاک، مواد غذایی مورد نیاز، قبل از کشت به صورت محلول تهیه و با خاک کاملاً مخلوط گردید (جدول ۲). علاوه بر مواد غذایی که به خاک داده شد، به نیمی از گلدان‌ها (ترکیبات تیماری دارای روی) عنصر روی به صورت $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ افزوده شد (باغبان طبیعت و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۱).

جدول ۲: ترکیب شیمیایی محلول (مواد) غذایی مورد استفاده در آزمایش

مقدار (میلی‌لیتر بر کیلوگرم)	غلظت (گرم بر لیتر)	اجزا
۳	(۴۸/۴۰۷) / (۳۰/۲۴۲)	K_2SO_4 / KH_2PO_4
۱	(۱۴۷/۰۱۶) / (۳۰/۰۵) / (۹۳)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O / MgSO_4 \cdot 7H_2O / NH_4NO_3$
۲	(۷/۵) / (۰/۰۸۳) / (۱/۰۵) / (۰/۰۳۳)	$MnSO_4 \cdot H_2O / Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O / CuSO_4 \cdot 5H_2O / H_3BO_3$
۱/۶۷	(۱۳/۱۴)	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

به‌منظور کشت، بذور ارquam به مدت سه دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت پنج دقیقه با آب اکسیژنه یک درصد ضدعفونی و در نهایت با آب قطره‌آب کشی شد. بذور (۱۰ عدد بذر)، در لوله‌های پلی‌اتیلنی به ارتفاع ۳۴ و قطر ۱۱ سانتی-متر، حاوی چهار کیلوگرم خاک شنی کشت و بعد از ۵ روز، تعداد گیاهان در هر گلدان به هفت عدد کاهش داده شد. به‌منظور تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاهان در طول فصل رشد، هر دو هفته یکبار، محلول نیترات آمونیوم به همراه آب آبیاری

به گلدان‌ها اضافه گردید (جدول ۲). در طول فصل رشد، با استفاده از آب دوبار تقطیر در حد ظرفیت زراعی آبیاری انجام شد. نمونه‌برداری از ریشه و برگ گیاهان (۴ بوته) در دو مرحله روشی (۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی) و زایشی (۳۰ درصد سنبله‌دهی) انجام گردید. بعد از برداشت نمونه‌های گیاهی در هر مرحله، ریشه و شاخصاره (برگ) از هم جدا و جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها و صفات بیوشیمیایی به یخچال -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. صفات اندازه‌گیری شده شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز^۱ (Beauchamp and Fridovich, 1971)، کاتالاز^۲ (Aebi, 1984)، آسکوربات پراکسیداز^۳ (Nakano and Asada, 1981)، پراکسیداز^۴ (MacAdam *et al.*, 1992) و همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز^۵ (D'Cunha *et al.*, 1996) و میزان مالون دی‌آلدئید^۶ (Popham and Novacky, 1991) پراکسید هیدروژن^۷ (Velikova, 2000)، فتل^۸ (Tawaha *et al.*, 2007)، پرولین^۹ (Bates *et al.*, 1973) و آنتی-اکسیدانت کل^{۱۰} (Espin *et al.*, 2000) با اندازه‌گیری تغییرات بود. جهت اطمینان از صحّت انتخاب ارقام روی-کارا و روی-ناکارا، شاخص‌های روی کارایی برای هر کدام از ارقام محاسبه شد. برای محاسبه این شاخص، وزن ریشه، شاخصاره و هزار دانه یک رقم در شرایط کمپود روی اندازه‌گیری و بر وزن همان رقم در شرایط روی کافی تقسیم گردید (با غبان طبیعت و رسولی صدقیانی، ۱۳۹۱). آزمون نرمالیته داده‌ها و خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MINITAB (نسخه ۱۹) انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها (بهروش دانکن در سطح یک درصد) توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد.

نتایج و بحث

شاخص روی کارایی ارقام

جهت اطمینان از صحّت انتخاب ارقام مورد استفاده در این تحقیق به لحاظ کارایی جذب روی، شاخص روی کارایی کل برای هریک از ارقام محاسبه شد (جدول ۳). در بین ارقام مورد مطالعه، به‌طور متوسط ارقام بیات، نیکنژاد، کرج ۱ و هیرمند به ترتیب با ۰/۹۷، ۰/۹۲، ۰/۸۸ و ۰/۸۳ دارای بیشترین تا کمترین روی کارایی بودند. Khoshgoftarmanesh و همکاران (۲۰۰۹) شاخص روی کارایی را برای ارقام بیات، نیکنژاد، کرج ۱ و هیرمند به ترتیب ۰/۸۸، ۰/۸۵، ۰/۸۳ و ۰/۸۷

1- Superoxide dismutase

2- Catalase

3- Ascorbate peroxidase

4- Peroxidase

5- Phenylalanine ammonia lyase

6- Malondialdehyde

7- Hydrogen Peroxide

8- Phenol

9- Proline

10- DPPH: 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

گزارش کردند، در حالی که بر اساس نتایج باگبان طبیعت و رسولی صدقیانی (۱۳۹۱)، این مقدار برای ارقام بیات، نیکنژاد، کرج ۱ و هیرمند به ترتیب $۱/۰۴$ ، $۰/۸۴$ و $۰/۷۳$ بود.

جدول ۳: شاخص روى کارابي (Zn efficiency) ارقام گندم نان بر اساس بافت‌های مختلف فعالیت آنزیم‌های آنتی-

اکسیدانت و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

میانگین	دانه	شاخصاره	ریشه	
۰/۹۷	۰/۹۵	۰/۹۸	۰/۹۸	بیات
۰/۹۲	۰/۹۴	۰/۸۸	۰/۹۴	نیکنژاد
۰/۸۳	۰/۸۹	۰/۸۰	۰/۷۹	هیرمند
۰/۸۸	۰/۹۱	۰/۸۳	۰/۸۹	کرج ۱

نتایج جدول ۴ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثر اصلی روی نشان داد در شرایط کمبود روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (شکل ۱-b)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۱-c) و فنیل آلانین آمونیالیاز (شکل ۱-d) بهطور معنی‌داری (P < 0.01) افزایش، درحالی‌که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۱-a) در این شرایط بهطور معنی‌داری کاهش یافت. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یک آنزیم محتوی روی است (Chen et al., 2009) و کمبود روی خاک باعث می‌شود بهطور قابل ملاحظه‌ای از فعالیت این آنزیم کاسته شود. Chen و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت این آنزیم در هر دو ژنوتیپ روی-کارا و روی-ناکارای برنج در شرایط کمبود روی کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی در نخود فرنگی (Hacisalihoglu et al., 2003) و نخود سیاه (Gupta et al., 2011) گزارش شده Pandey et al., 2012) است. همچنین Chen و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه ارقام روی-کارا و روی-ناکارای برنج در شرایط کمبود روی بهطور معنی‌داری بیشتر می‌شود. البته Gupta و همکاران (۲۰۱۱)، کاهش در مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در شرایط کمبود روی در نخود سیاه گزارش کردند. در تحقیق دیگری که روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام روی-کارا و روی-ناکارای برنج، تحت شرایط کمبود شدید، کمبود متوسط و مقدار کافی روی انجام گرفت، گزارش شد که فعالیت این آنزیم در شرایط کمبود متوسط روی به حداقل می‌رسد که این افزایش نشان‌دهنده افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی در برابر شرایط تنش کمبود روی است (Chen et al., 2009).

جدول ۴ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین برهمکنش نشان داد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۱-a)، فنیل آلانین آمونیالیاز (شکل ۱-b)، کاتالاز (شکل ۱-c) و آسکوربات پراکسیداز (شکل ۱-d) بهطور معنی‌داری (P < 0.01) در ارقام روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکارا می‌باشد. قبل‌اً هم گزارشاتی مبنی بر وجود همبستگی بین فعالیت

آنژیم مس/روی-سوپراکسید دیسموتاز^۱ و روی کارایی در بین و داخل گونه‌های مختلف غلات ارائه شده بود (Yu et al., ۲۰۰۳) گزارش کردند که سطوح بالاتری از فعالیت آنژیم- های حاوی روی به خصوص آنژیم سوپراکسید دیسموتاز در ارقام روی-کارایی گندم در شرایط کم‌بود روی مشاهده می‌شود.

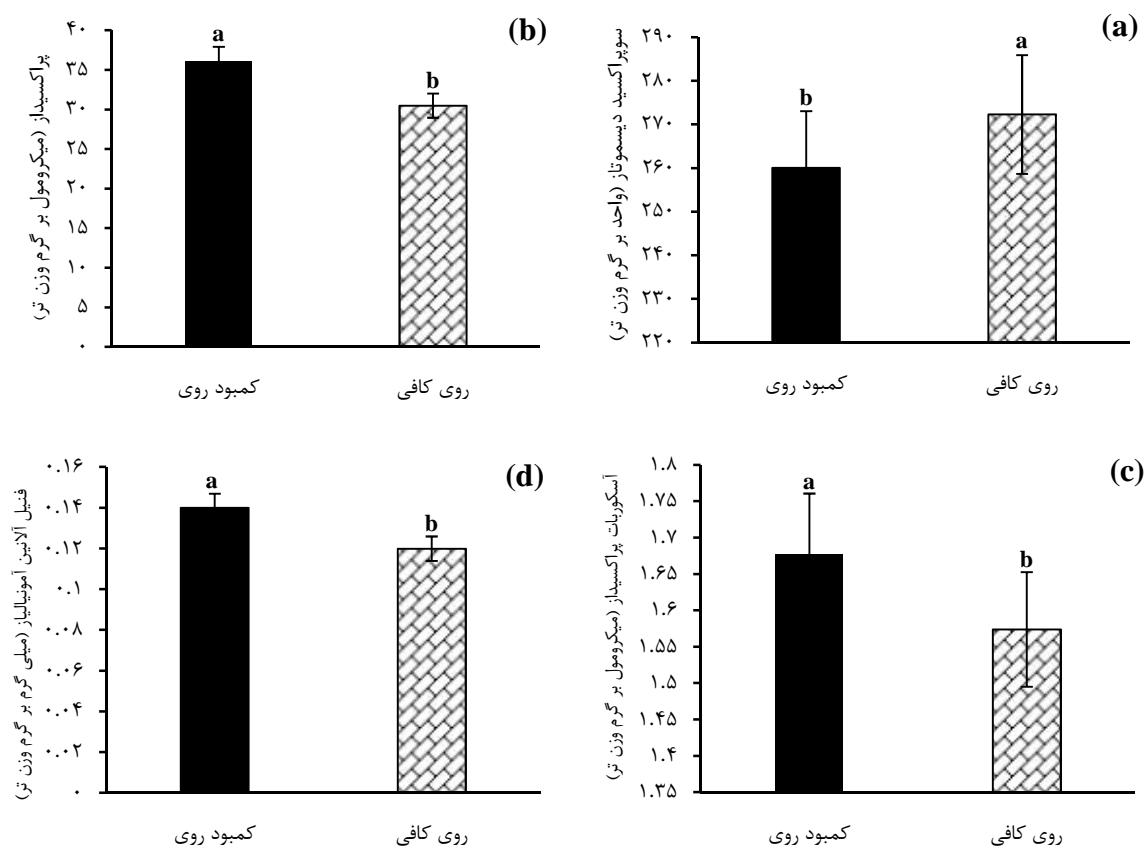
جدول ۴: نتایج تجزیه واریانس اثر کم‌بود روی بر فعالیت آنژیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنژیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز در

گندم نان

میانگین مربعات (MS)						
منابع تغییر	df	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	فیل آلانین- آمونیالیاز
روی	۱	۳۶۰/۱۵۰**	۴/۹۹**	۷۵۸/۸۵**	۰/۲۵*	۰/۰۱*
بافت	۱	۱۵۸۱۰/۶۷**	۹/۱۲**	۱۵۶۰/۹۶**	۱۰۶/۷۹**	۱/۱۱**
رقم	۳	۲۵۸۹/۸۹**	۲/۵۴**	۱۱۳/۴۱*	۹/۱۲**	۰/۰۰۸*
مرحله	۱	۱۷۸۲۱/۵۰**	۰/۰۷ns	۸۶۰/۴۹**	۰/۳۱ns	۰/۲۱**
روی × بافت	۱	۱۲۱/۵.ns	۰/۲۸ns	۱/۹۶ns	۰/۰۱ns	۰/۰۰۰۴ns
روی × رقم	۳	۱۳۳/۸۶ns	۱/۷۶**	۲۶/۹۳ns	۰/۷۱ns	۰/۰۰۳ns
روی × مرحله	۱	۱۹۷/۳۹ns	۰/۰۰۰۵ns	۱۳/۸۷ns	۰/۰۶ns	۰/۰۰۰۸ns
بافت × رقم	۳	۱۲۳/۷۵ns	۰/۲۰ns	۱۰/۱۵۵*	۷/۰۱**	۰/۰۰۴ns
بافت × مرحله	۱	۱۰۴۷۵/۱۲**	۰/۳۹ns	۳۸۱۳/۱۵**	۰/۳۸ns	۰/۱۶**
رقم × مرحله	۳	۴۱۴/۹۷ns	۰/۲۳ns	۴۲۷/۰۱**	۳/۰۹ns	۰/۰۰۳ns
روی × بافت × رقم	۳	۱۰۳/۲۹ns	۰/۴۲ns	۳۵/۱۳ns	۰/۷۶ns	۰/۰۰۴ns
روی × رقم × مرحله	۳	۱۳۴/۴۵ns	۰/۱۵ns	۳۱/۹۲ns	۰/۰۹ns	۰/۰۰۴ns
روی × بافت × مرحله	۱	۶۰/۶۶ns	۰/۰۹ns	۰/۰۲ns	۰/۰۰۱ns	۰/۰۰۰۱ns
بافت × رقم × مرحله	۳	۳/۲۰ns	۰/۹۵**	۲۷۴/۲۴**	۳/۲۷ns	۰/۰۰۳ns
روی × بافت × رقم × مرحله	۳	۱۰۴/۴۳ns	۰/۱۱ns	۱۶/۱۱ns	۰/۷۷ns	۰/۰۰۴ns
خطا	۶۴	۲۳۵/۵۶	۰/۱۸	۳۲/۲۲	۱/۴۱	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (%)		۵/۷۶	۳۵/۰۱	۱۷/۰۵	۷۳/۰۶	۳۴/۲۰

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns: غیرمعنی‌دار، عامل اول: عنصر روی شامل دو سطح عدم مصرف روی و کاربرد ۵ میلی- گرم روی در کیلوگرم خاک، عامل دوم: بافت‌های نمونه‌برداری شده شامل ریشه و برگ، عامل سوم: رقم شامل ارقام روی-کارا (بیات و نیکنژاد) و روی-ناکارا (هیرمند و کرج ۱)، عامل چهارم: مرحله نمونه‌برداری شامل نمونه‌برداری در دو مرحله ۲۸ روز بعد از جوانه‌زنی (رویشی) و ۳۰ درصد

سنبله‌دهی (زایشی)

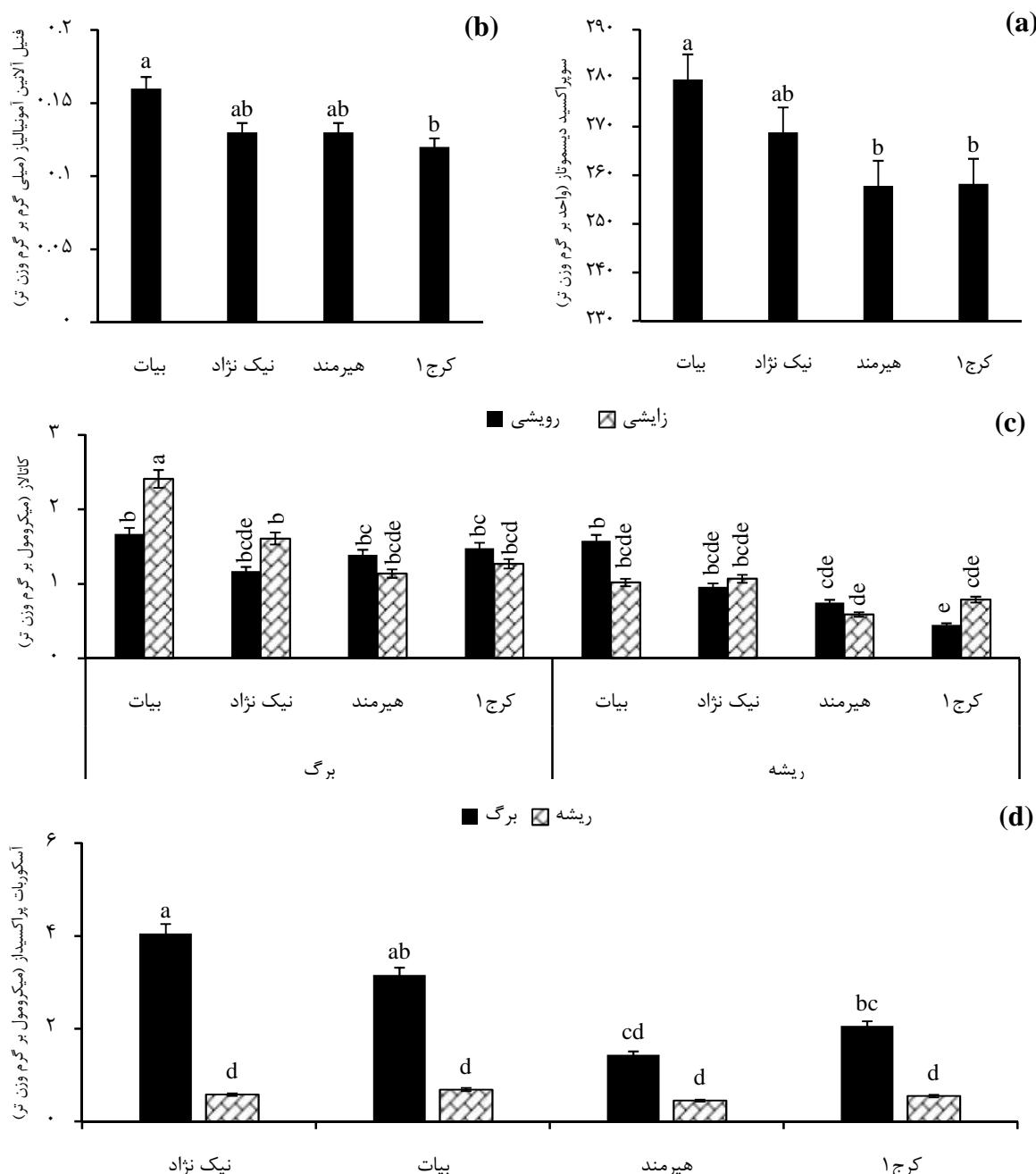


شکل ۱: مقایسه میانگین اثر اصلی سطوح روی بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (a)، آسکوربات پراکسیداز (c) و فنیل آلانین آمونیالیاز (d) در گندم نان

در تحقیق حاضر نیز بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در رقم روی-کارای بیات (با متوسط روی کارایی ۹۶/۷۵ درصد) و کمترین میزان فعالیت آن در رقم هیرمند (با متوسط روی کارایی ۷۷/۵ درصد) مشاهده شد. همچنین آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ ارقام روی-کارا نسبت به ارقام روی-ناکارا فعالیت بیشتری نشان داد (شکل ۲-d). در نخود فرنگی (Gupta *et al.*, 2011) و نخود سیاه (Pandey *et al.*, 2012) کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام روی-ناکارا به عنوان عاملی برای افزایش تجمع آسکوربات^۱ و پراکسید هیدروژن^۲ در این ارقام گزارش شد. در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز هم در ارقام روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکارا بود. در مقایسه فعالیت دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مشاهده شد که آنزیم آسکوربات پراکسیداز به طور قابل توجهی نسبت به کاتالاز دارای فعالیت بیشتری است (شکل ۲-d و شکل c). فعالیت بالای آسکوربات پراکسیداز بر اثر تنفس کمبود روی می‌تواند ناشی از نقش کلیدی این آنزیم در حذف پراکسید هیدروژن باشد که نسبت به کاتالاز میل ترکیبی و حساسیت بیشتری به

1- Ascorbat
2- H₂O₂

پراکسید هیدروژن داشته و نقش مهمی در مدیریت گونه های فعال اکسیژن در شرایط تنش ایفاء می کند (Gill and Tuteja, 2010).

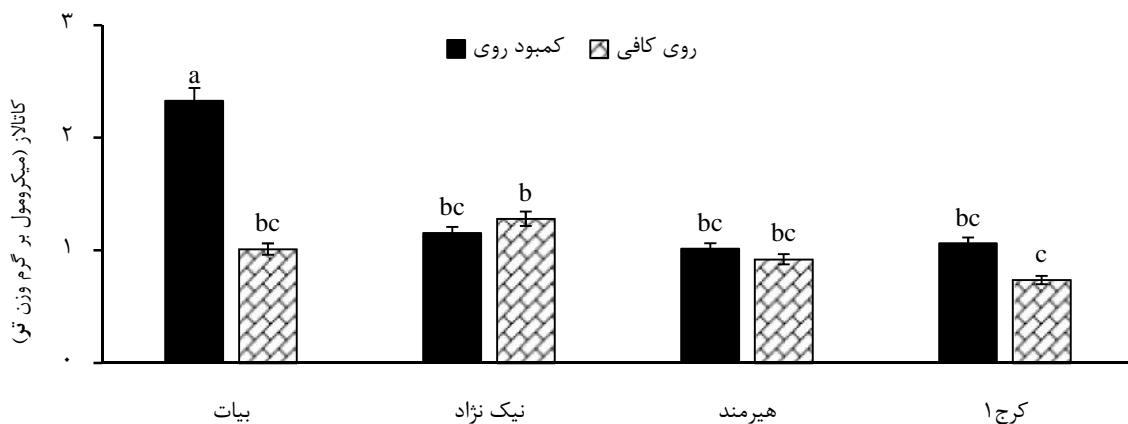


شکل ۲: مقایسه میانگین اثر رقم بر فعالیت آنزیم های سوبراکسید دیسموتاز (a) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (b) و

برهمکنش بافت × رقم × مرحله (c) و رقم × بافت (d) به ترتیب بر فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گندم

(ستون هایی که دارای حروف مشترک می باشند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

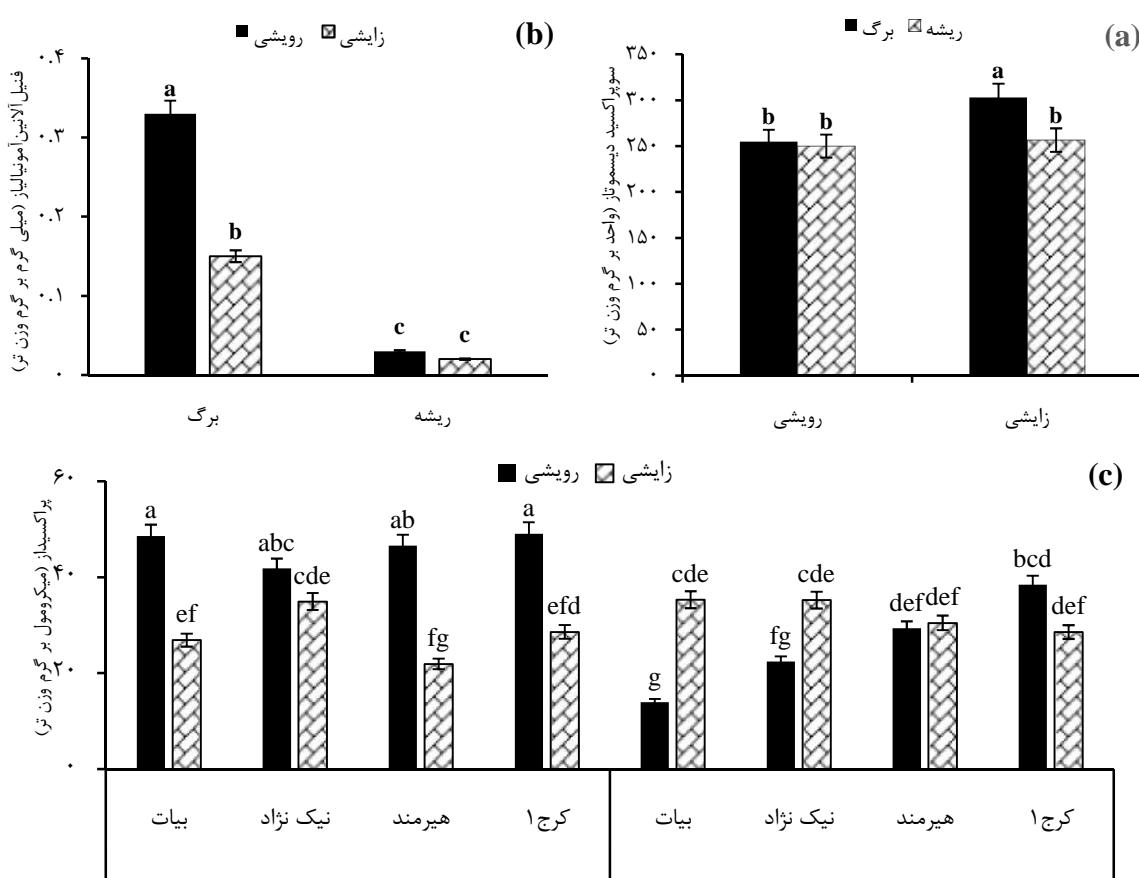
پراکسیداز به همراه سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، متالوآنزیم‌های درگیر در دفاع سلولی بر علیه تنفس اکسیداتیو هستند. از آنجا که آنزیم پراکسیداز، در شرایط تنفس‌های زیستی و غیرزیستی تحت تأثیر قرار می‌گیرد این آنزیم می‌تواند به عنوان نشانگری برای شرایط تنفس استفاده شود (Chen *et al.*, 2012) گزارش کردند که این آنزیم با فعالیت بیشتر در ارقام روی-کارای گندم در شرایط کمبود روی، دارای قابلیت بیشتری در حذف انواع گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. Pandey و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تحت شرایط کمبود روی در نخود فرنگی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام روی-کارا نسبت به ارقام روی-ناکارا به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در نخود سیاه نیز افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط کمبود روی گزارش شده است (Gupta *et al.*, 2011). نتایج جدول ۴ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم روی-کارای بیات در شرایط کمبود روی مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت این آنزیم در رقم روی-ناکارای کرج ۱ در شرایط روی کافی مشاهده شد (شکل ۳). در نخود فرنگی نیز کاهش شدید فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام روی-ناکارا، در شرایط کمبود روی گزارش شده است (Pandey *et al.*, 2012) و همکاران (۲۰۰۹) نیز نتایج مشابهی در ارقام روی-کارا و روی-ناکارای برنج گزارش کردند.



شکل ۳: مقایسه میانگین برهمکنش سطوح روی×رقم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

نتایج تجزیه واریانس جدول ۴ و مقایسه میانگین نشان داد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۴-a)، کاتالاز (شکل ۴-c)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۴-d) و فیل آلائین آمونیالیاز (شکل ۴-b) در برگ نسبت به ریشه و آنزیم پراکسیداز (شکل ۴-c) در ریشه نسبت به برگ به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) بیشتر است. Pandey و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که فعالیت آنزیم کاتالاز تحت شرایط کمبود روی در برگ ارقام نخود فرنگی بیشتر از ریشه می‌باشد.



شکل ۴: مقایسه میانگین برهمنکنش بافت مرحله بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (a) و فنیل آلانین

آمونیاکیاز (b) و اثر بافت×رقم مرحله بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (c) در گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

صفات بیوشیمیایی

نتایج جدول ۵ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (شکل ۵-a) نشان می‌دهد در مرحله زایشی در برگ و در مرحله رویشی در ریشه اختلاف معنی‌داری بین شرایط کمبود روی و روی کافی به لحاظ مقدار آنتی‌اکسیدانت کل مشاهده نشد ولی مقدار آنتی‌اکسیدانت کل در برگ در مرحله رویشی و در ریشه در مرحله زایشی در شرایط روی کافی به طور معنی‌داری بیش از شرایط کمبود روی بود. تعادل بین تولید و سمزدایی گونه‌های فعال اکسیژن، عمدتاً توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی که شامل سیستم آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است ایجاد می‌شود (Mittler *et al.*, 2004). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیاء توسط فرایندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون، رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می‌شود. ترکیباتی که قابلیت انجام این تخریب را دارند به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت شناخته می‌شوند (امیرجانی و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج نشان می‌دهد همراه با افزایش مقدار روی محیط، میزان تخریب DPPH

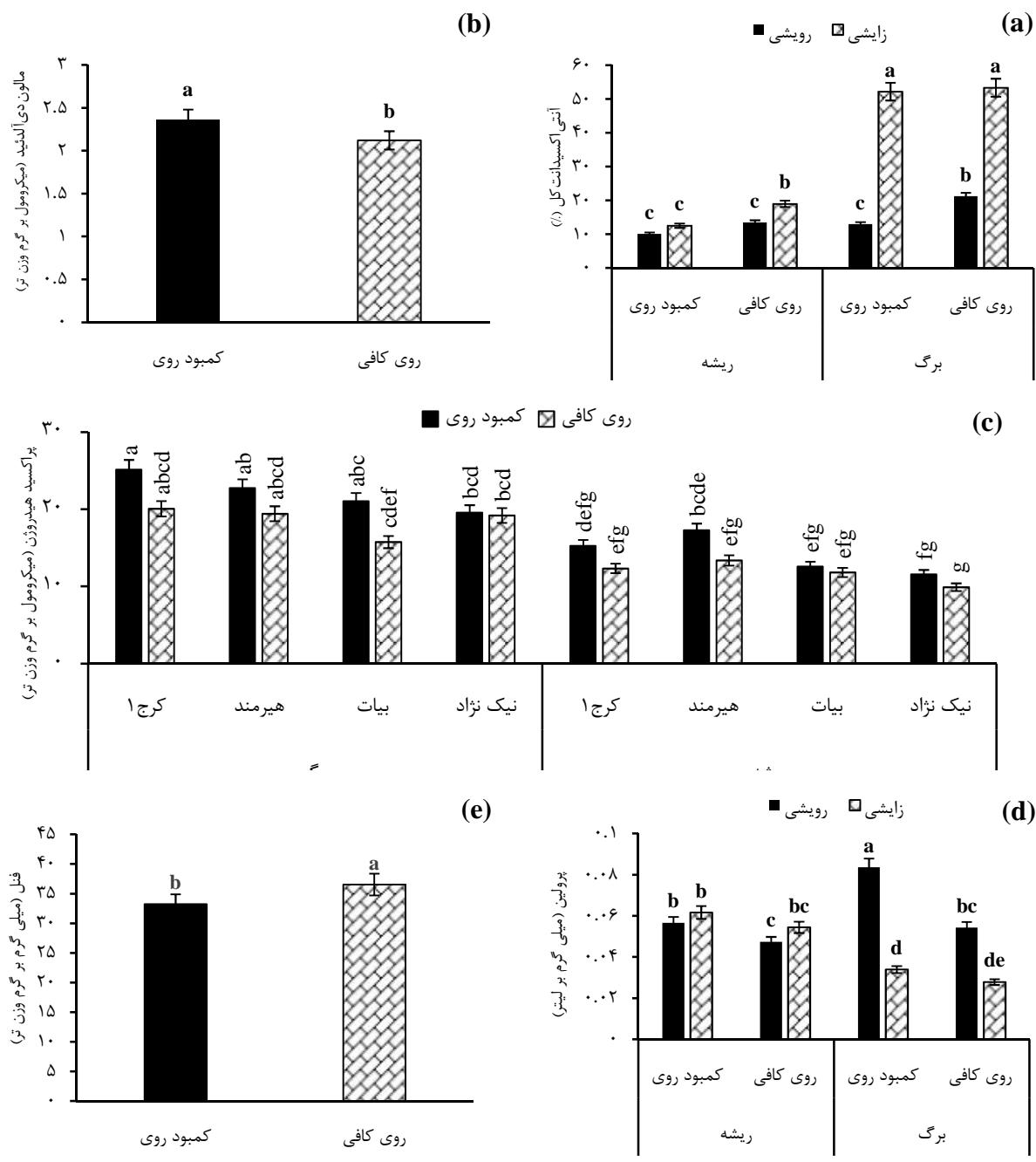
(درصد تخریب رادیکال‌های آزاد) افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد با افزایش روی، گیاه قادر به تولید آنتی‌اکسیدانت بیش‌تری بوده و در نتیجه درصد بیش‌تری از رادیکال‌های آزاد تخریب می‌شوند. بنابراین احتمالاً با افزایش میزان روی در محیط، گیاه می‌تواند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی را تقویت و در برابر آسیب‌های ناشی از تنفس‌های محیطی از خود محافظت نماید (Mittler *et al.*, 2004). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که مقدار مالون دی آلدئید در شرایط کمبود روی به‌طور معنی‌داری نسبت به شرایط روی کافی افزایش یافت (شکل b-۵). تنفس اکسیداتیو زمانی روی می‌دهد که تولید گونه‌های - فعال اکسیژن بیش‌تر از ظرفیت سمزدایی در سلول باشد. این واقعه باعث عدم تعادل در هوموستازی و در نتیجه افزایش سریع گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Sharma *et al.*, 2012). یکی از واکنش‌هایی که در حضور گونه‌های فعال اکسیژن سرعت بیش‌تری پیدا می‌کند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مثل مالون دی آلدئید می‌شود (Yan *et al.*, 1996). تنفس کمبود روی از طریق القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش مالون دی آلدئید می‌شود. افزایش مالون دی آلدئید در اثر پراکسیداسیون چربی و مقدار پراکسید هیدروژن به عنوان شاخصی برای سنجش تنفس اکسیدانتی در شرایط کمبود روی توسط Chen و همکاران (۲۰۰۹) در ارقام برجسته شد. آن‌ها مشاهده کردند که در شرایط کمبود روی، پراکسیداسیون چربی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد در تمامی ارقام افزایش پیدا می‌کند. Sharma و همکاران (۲۰۰۴)، افزایش مالون دی آلدئید در شرایط کمبود روی را در گندم نان گزارش کردند. آن‌ها مشاهده کردند با شدت یافتن کمبود روی، غلظت مالون دی آلدئید افزایش می‌یابد و با تأمین مجدد روی در محیط کشت، مقدار مالون دی آلدئید به شدت کاهش پیدا می‌کند. نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد پراکسید هیدروژن به‌طور معنی‌داری (P < 0.01) در شرایط کمبود روی بیش‌تر از شرایط روی کافی بود (شکل ۵-۵). در اثر تنفس‌های زیستی و غیرزیستی گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ایجاد می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن در اثر تنفس‌های مختلف منجر به تنفس‌های اکسیداتیو می‌شود که به DNA، پروتئین، رنگیزه‌ها و همچنین پراکسیداسیون چربی‌ها آسیب رسانده و درنهایت منجر به مرگ سلول می‌گردد. در نخود سیاه مشاهده شد تحت شرایط تنفس کمبود روی، غلظت پراکسید هیدروژن در هر دو مرحله نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد (Gupta *et al.*, 2011). افزایش پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود روی در گندم توسط Sharma و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است. آن‌ها مشاهده کردند با شدت یافتن کمبود روی، غلظت پراکسید هیدروژن افزایش و افزودن روی به محیط منجر به کاهش غلظت پراکسید هیدروژن می‌شود. نتایج جدول ۵ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین نشان می‌دهد پرولین به‌طور معنی‌داری (P < 0.01) در شرایط کمبود روی بیش‌تر از شرایط روی کافی بود (شکل ۵-d).

جدول ۵: نتایج تجزیه واریانس اثر کم بود روی برآکتورهای بیوشیمیابی در گندم نان

(MS) میانگین مربوطات (MS)

آنتی اکسیدانت کل	فزل	بیولیسن	برآکسید هیدروژن	مأون دی آلدید	df	مانع تغییر
۵۵۵۷/۸۴۰	۲۶۱/۴۴۰	۰/۰۰۴۰	۸۷/۹۲۰	۱/۴۰	۱	روی
۱۰۷۴۲/۹۱۰	۳۴۹/۷۸۱	۰/۰۰۴۰	۹۶۹/۲۶۰	۴۸/۸۴۰	۱	بافت
۴۲/۹۳۰	۴۹۹/۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۱۴۶/۸۲۰	۱/۰۰	۳	رقم
۹۲۵۲۰	۲۵۵۷/۱۵۹	۰/۰۰۴۰	۳۰/۳۹۰	۱۲/۸۵	۱	مرحله
•۱۲۷۱۱۰	۱۱/۰۵۰	۰/۰۰۰۵	۳/۵۸۰	۰/۱۰	۱	روی × بافت
۲۳۰/۱۰۰	۲۳۰/۱۰۰	۰/۰۰۰۲	۵۰/۳۶۰	۰/۲۱	۳	روی × رقم
۱۶۷۴۰	۶/۷۹۰	۰/۰۰۰۹	۱۱/۹۷۰	۰/۱۱	۱	روی × مرحله
۱۷۷۸۰	۲۲/۰۴۰	۰/۰۰۰۱	۲۰/۱۴۰	۳/۱۵۰	۳	بافت × رقم
۵۹۷۸/۳۹۰	۸/۸۷۰	۰/۰۱۰	۱۹/۱۳۰	۵/۴۵	۱	بافت × مرحله
۹۷۱۱۴۰	۹۷۱۱۴۰	۰/۰۰۰۱۰	۳۲/۹۳۰	۰/۱۰	۳	رقم × مرحله
۱۳۳۴۰	۲۸/۴۱۰	۰/۰۰۱۰	۴۸/۳۳۰	۰/۰۳۰	۳	روی × بافت × رقم
۱۱۲۲۰	۱۱۲۲۰	۰/۰۰۰۱۰	۲۲/۴۹۰	۰/۰۰	۳	روی × رقم × مرحله
۱۵۵۱۱۴۰	۷۹/۷۳۰	۰/۰۰۰۴۰	۰/۱۹۰	۰/۰۱۰	۱	روی × بافت × مرحله
۸۹۱۸۷۰	۹۲/۰۷۰	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۱۲/۷۳۰	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۳	بافت × رقم × مرحله
۲۱۰۲۰	۱۳/۸۴۰	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۱۲/۳۲۰	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۳	روی × بافت × رقم × مرحله
۱۱۱۵۰	۲۱/۰۸۰	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۱۰/۰۲۰	۰/۰۲۵	۹۴	خطا
۱۳۹۵	۱۳۰۸	۱/۴۳۰	۱۹/۸۸۰	۲۲۲۷	۲۲۲۷	ضريب تغييرات (%)

* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ^{ns}: غیرمعنی دار، عامل اول: عنصر روی شامل دو سطح عدم مصرف روی و کاربرد ۵ میلی گرم روی در کیلوگرم خاک، عامل دوم: بافت‌های نمونه‌داری شده شاله ریشه و برگ، عامل سوم: رقم شامل ارقام روی-کارا (بیانات و نیکنزناد) و روی-ناکارا (هیبرمند و کرج) و عامل چهارم: مرحله نمونه‌داری شامل نمونه‌داری در دو مرحله ۲۸ روز بعد از جوانشی (روشنی) و ۳۰ درصد سنبله‌دهی (زاپشی)

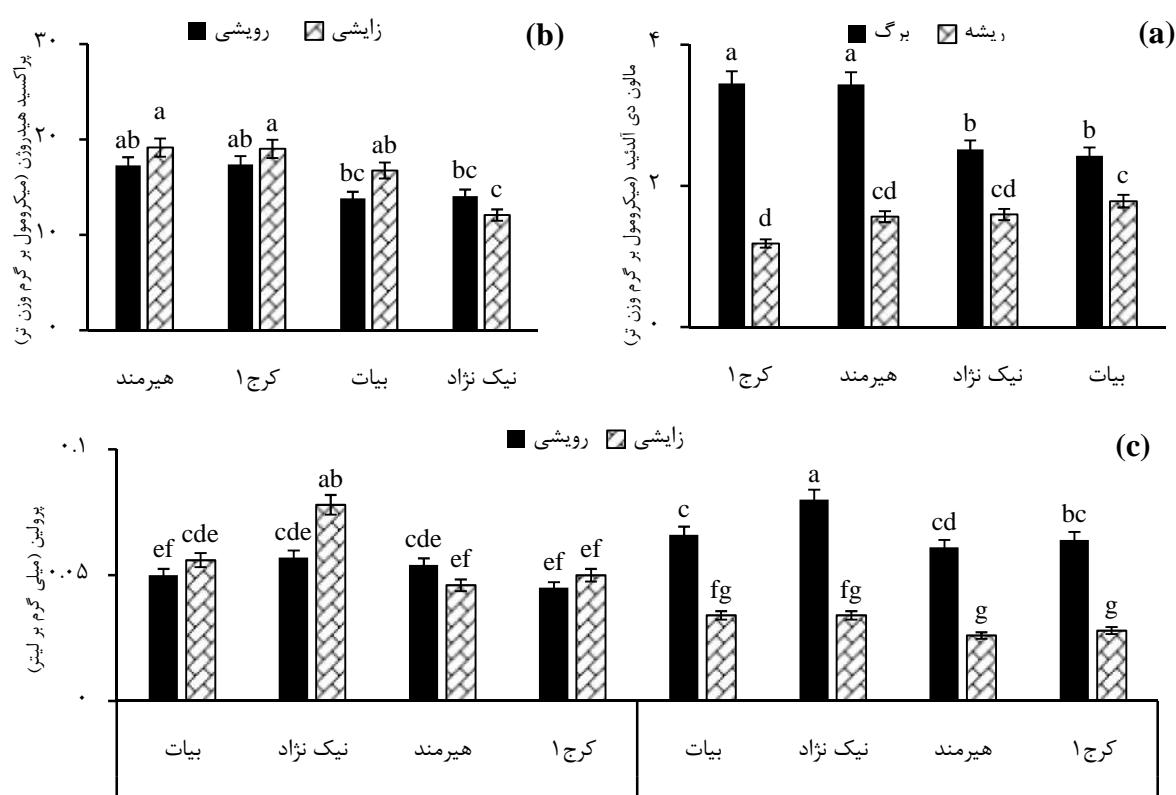


شکل ۵: مقایسه میانگین اثر بافت×روی×مرحله بر مقدار آنتی‌اکسیدانت کل (a) اثر سطوح روی بر میزان مالون دی‌آلدئید (b)، اثر بافت×رقم×روی بر پراکسید هیدروژن (c) اثر بافت×روی×مرحله بر پروولین (d) و اثر سطوح روی بر مقدار فنل (e) در گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

پروولین به عنوان یک اسمولیت سازگار، بدون تخریب مولکول‌های بزرگ در سلول تجمع یافته (Hare *et al.*, 1998) و دارای نقش حفاظتی نیز می‌باشد. بدین صورت که در زمان تنفس‌های محیطی شدید از آسیب به غشاء و واسرشتگی

پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند (Hare *et al.*, 1999). بنابراین احتمالاً کاهش مقدار روی محیط باعث تجمع پرولین در برگ و ریشه شده و گیاه از این طریق در صدد کاهش میزان خسارت ناشی از این تنفس محیطی می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) و مقایسه میانگین نشان می‌دهد مقدار فنل در شرایط کم بود روی بطور معنی‌داری ($P < 0.01$) کاهش یافت (شکل ۵). حجازی مهریزی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش کردند که با افزایش مقدار روی در رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، غلظت ترکیبات فنلی نیز در گیاه بالا می‌رود. اگر چه دلیل مشخصی برای این افزایش تاکنون ذکر نشده اما نقش روی در استفاده از کربن برای ساخت ترکیبات فنلی در چرخه اسید شیکمیک و استات می‌تواند یکی از دلایل این افزایش باشد (Misra *et al.*, 2006). همچنین نتایج نشان می‌دهد که مقدار مالون دی‌آلدئید در برگ (شکل ۶-a) و پراکسید هیدروژن در هر دو بافت (شکل ۶-b) در ارقام روی - ناکارا نسبت به ارقام روی - کارا و مقدار پرولین در برگ ارقام روی - کارا (شکل ۶-c) بطور معنی‌داری ($P < 0.01$) بیشتر از ارقام روی - ناکارا بود. بهنظر می‌رسد ارقام روی - کارا با استفاده از حداقل روی موجود در محیط، قادرند از تنفس اکسیدانتی ایجاد شده در اثر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن که موجب پراکسیداسیون چربی‌های غشایی می‌شوند جلوگیری کنند.

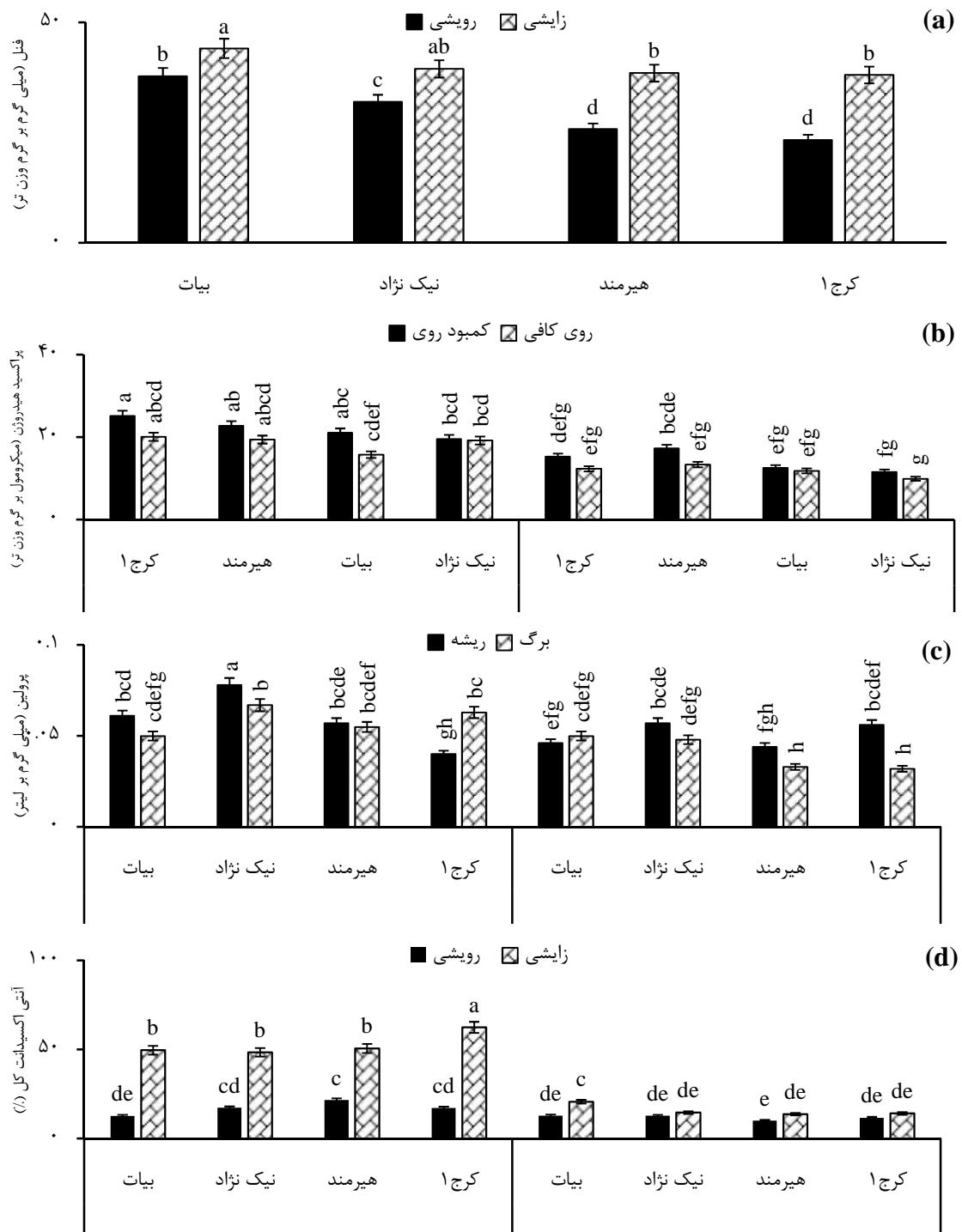


شکل ۶: مقایسه میانگین اثر رقم×بافت بر مقدار مالون دی‌آلدئید (a)، اثر رقم×مرحله بر مقدار پراکسید هیدروژن (b) و اثر بافت×رقم×مرحله بر مقدار پرولین (c) در گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

در مطالعه‌ای که توسط Pandey و همکاران (۲۰۱۲) روی نخود فرنگی انجام شد، مشاهده شد در ژنوتیپ روی-ناکارا، رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در اثر فعالیت پائین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سبب پراکسیداسیون شدید لیپیدی در سلول‌ها می‌گردد. همچنین آن‌ها نشان دادند در برگ‌های ژنوتیپ روی-کارا فعالیت آنزیم‌های جاروب‌کننده باعث تجمع کم پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای لیپیدی می‌گردد که نشانگر نقش محافظتی روی در برابر تنفس اکسیداتیو از طریق استفاده بهینه از روی سیتوپلاسمی برای فرایندهای بیوشیمیایی مانند سنتز و فعال‌سازی آنزیم‌ها می‌باشد. بر اساس گزارش Chen و همکاران (۲۰۰۹)، تحت شرایط کمبود روی، محتوای پراکسید هیدروژن روندی مشابه مalon دی‌آلدئید نشان می‌دهد. بهاین صورت که غلظت پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود متوسط و شدید روی در رقم روی-کارای برنج بسیار کمتر از رقم روی-ناکارا می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) و مقایسه میانگین نشان داد که در شرایط کمبود روی، مقدار پراکسید هیدروژن در ریشه و برگ ارقام روی-ناکارا (شکل b-7) به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. مقدار فنل (شکل a-7) نیز در ریشه و برگ و آنتی‌اکسیدانت کل (شکل c-7) و پرولین (شکل d-7) در ریشه ارقام روی-کارا به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) بیشتر بود. Gupta و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که آسیب اکسیداتیو تحت شرایط کمبود روی در نخود سیاه، به‌علت کاهش عملکرد آنزیم مس/اروی-سوپراکسید دیسموتاز، منجر به انباست یون‌های سوپراکسید می‌شود. این رادیکال‌های سوپراکسید ممکن است با پراکسید هیدروژن واکنش نشان دهند و رادیکال‌های بسیار سمی ایجاد کنند که سبب افزایش شدید پراکسیداسیون لیپید و آسیب اکسیداتیو در گیاهان در شرایط کمبود روی مخصوصاً در ارقام روی-ناکارا می‌شود. نتایج مشابهی توسط Chen و همکاران (۲۰۰۹) در مورد پراکسید هیدروژن در ارقام برنج با روی کارایی متفاوت گزارش شد. آن‌ها گزارش کردند که غلظت پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود متوسط و شدید روی در رقم روی-کارای برنج بسیار کمتر از رقم روی-ناکارا می‌باشد. Pandey و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند، کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ روی-ناکارا نخود فرنگی می‌تواند افزایش آسکوربات و پراکسید هیدروژن را در این ژنوتیپ توجیه کند. آن‌ها گزارش کردند که ژنوتیپ روی-ناکارا یک پاسخ منفی به کمبود روی نشان می‌دهد، بدین‌صورت که این ژنوتیپ با کاهش روی قابل دسترس باعث کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده و در نتیجه موجب افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن گردیده که آن‌هم به‌نوبه خود سبب آسیب اکسیداتیو در سلول گیاهی و اخلال در رشد گیاهان می‌شود. در نخود سیاه مشاهده شد تحت شرایط تنفس کمبود روی، غلظت پراکسید هیدروژن در هر دو مرحله نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد (Gupta *et al.*, 2011). همچنین علت افزایش ترکیبات فنلی در ارقام روی-کارا می‌تواند به‌دلیل افزایش روی قابل دسترس در این ارقام باشد. چنانچه قبل از نیز اشاره شد فعالیت آنزیم فنیل آلانین -

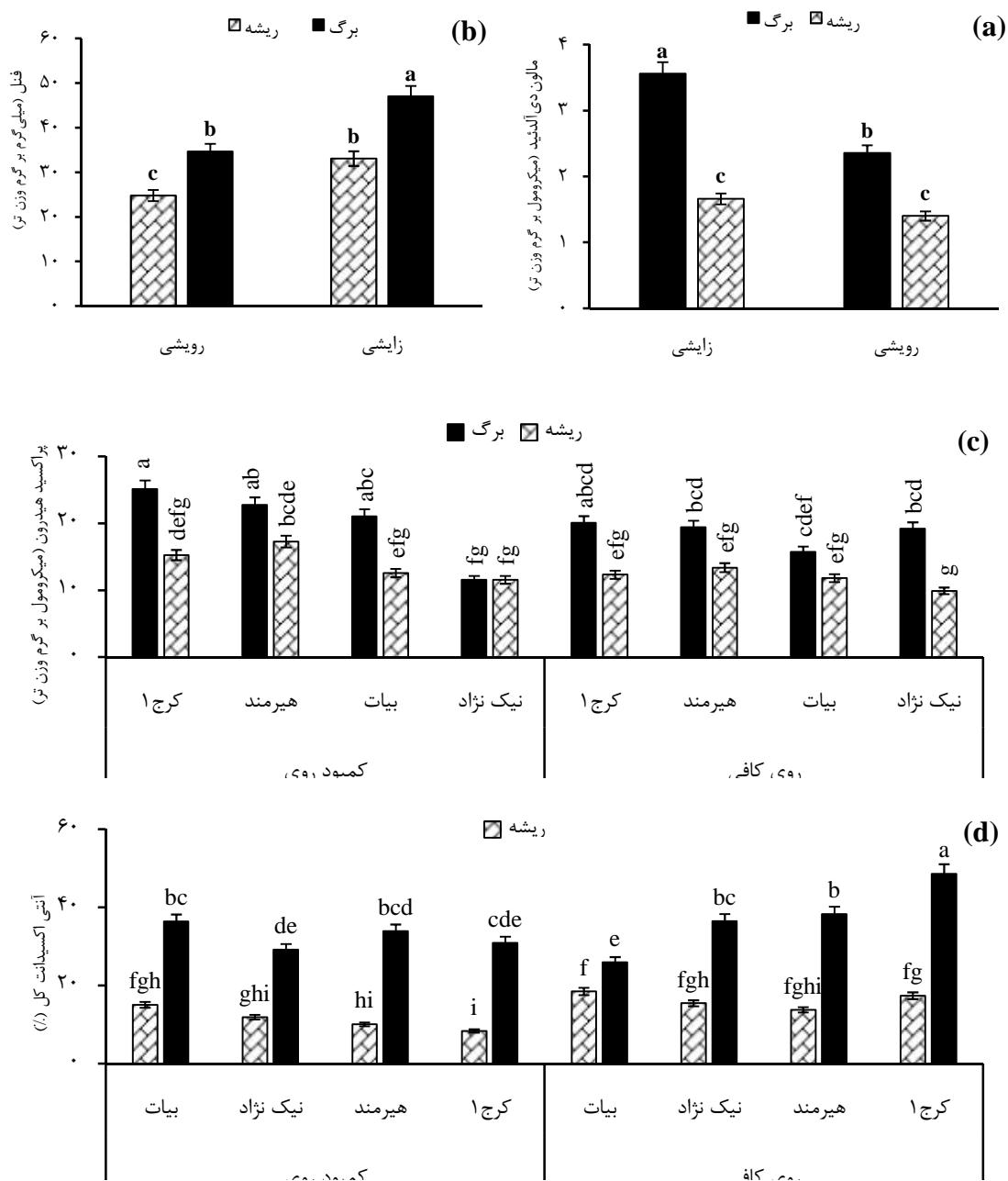
آمونیالیاز در ارقام روی-کارا بالاتر از ارقام روی-ناکارا بود (شکل ۷-۲). همچنین نتایج نشان داد میزان ترکیبات فلی در ارقام روی-کارا به طور چشمگیری بیشتر از ارقام روی-ناکارا میباشد (شکل ۷-۷).



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر رقم×مرحله بر میزان فل (a) و اثر روی×بافت×رقم بر مقدار پراکسیدهیدروژن (b) و پروولین (c) و اثر بافت×رقم×مرحله بر آنتی اکسیدانت کل (d) در گندم نان

(ستونهایی که دارای حروف مشترک میباشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

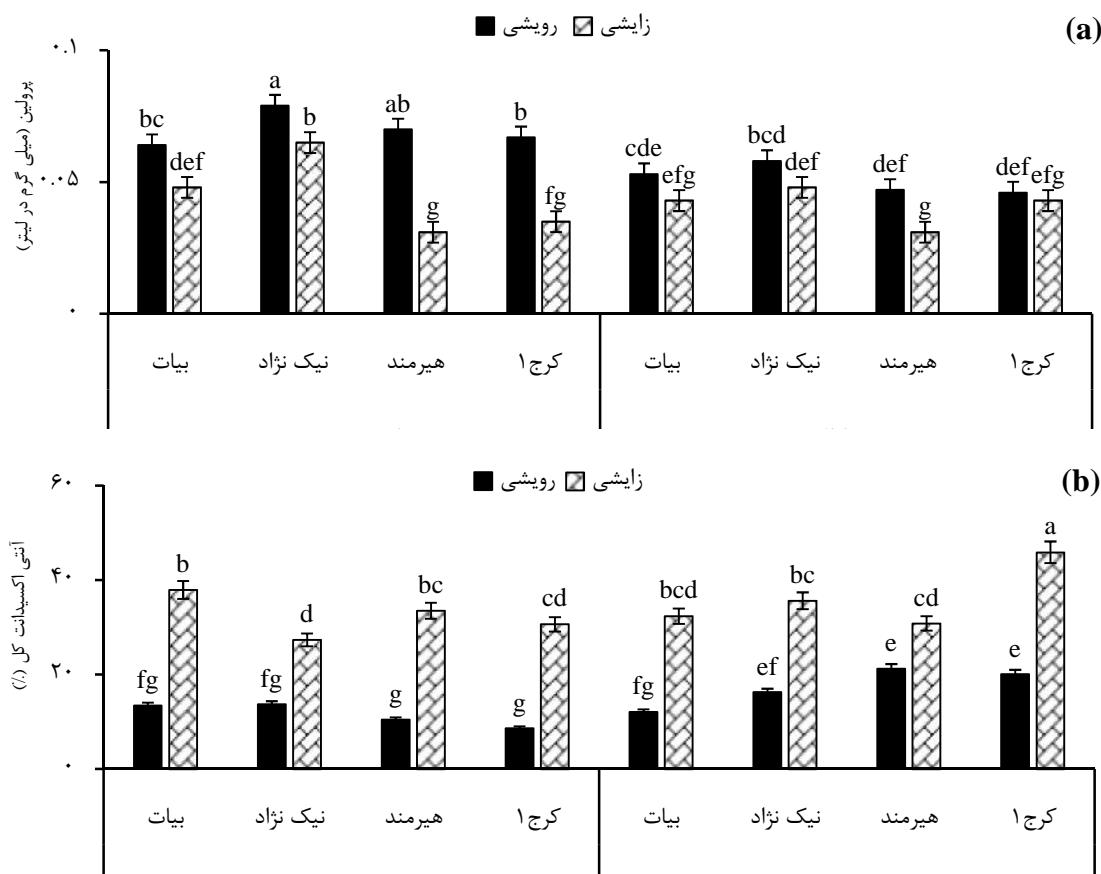
این ارتباط دور از انتظار نیست چون آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، آنزیم اصلی در اتصال مسیر سنتزی اسیدهای آمینه آромاتیک و متابولیت‌های ثانویه (ترکیبات فنلی) است و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانوئیدی ایفاء می‌کند (Bagal *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر مقدار مالون دی آلدئید (شکل a)، فنل (شکل b-a)، پراکسید هیدروژن (شکل c) و آنتی‌اکسیدانت کل (شکل d) در برگ بیشتر از ریشه بود.



شکل ۸: مقایسه میانگین اثر بافت×مرحله بر مقدار مالون دی آلدئید (a) و فنل (b) و اثر روی×رقم×بافت بر میزان پراکسید هیدروژن (c) و آنتی‌اکسیدانت کل (d) در ارقام گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

البته مقدار مالون دی آلدئید در برگ ارقام روی-ناکارا نسبت به ارقام روی-کارا بیشتر بود (شکل ۸-a) در حالی که برخلاف برگ، ریشه ارقام روی-کارا دارای مقدار مالون دی آلدئید بیشتری بود (شکل ۸-a). علت بیشتر بودن مالون دی آلدئید در برگ ارقام روی-ناکارا احتمالاً با کاهش فعالیت آنزیم‌های جاروب‌گر در این ارقام مرتبط باشد. همان‌طور که در شکل‌های (a)، (۲-c) و (۲-d) نیز مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به طور معنی‌داری در ارقام روی-ناکارا کمتر می‌باشد. کمبود فعالیت این آنزیم‌ها باعث پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی برگ ارقام روی-ناکارا شده و در نتیجه مقدار مالون دی آلدئید (شاخصی برای پراکسیداسیون چربی‌های غشایی) در شرایط کمبود روی، در برگ این ارقام بالا می‌رود (Chen *et al.*, 2009). نتایج به دست آمده نشان داد در شرایط کمبود روی مقدار پرولین در مرحله زایشی و مقدار آنتی‌اکسیدانت کل در مرحله رویشی در ارقام روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکارا می‌باشد در حالی که در شرایط روی کافی در هر دو مرحله رویشی و زایشی مقدار پرولین در ارقام روی-کارا بیشتر از ارقام روی-ناکار بود.



شکل ۹: مقایسه میانگین اثر روی × رقم × مرحله بر مقدار پرولین (a) و آنتی‌اکسیدانت کل (b) در گندم نان

(ستون‌هایی که دارای حروف لاتین مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که در شرایط کمبود روی، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، فنیل آلانین - آمونیالیاز و پراکسیداز افزایش، ولی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش می‌یابد. همچنین میزان مالون دی‌آلدئید، پرولین و پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود روی افزایش، ولی میزان فنل کاهش یافت. علاوه براین، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز در ارقام روی-کارا نسبت به ارقام روی-ناکارا بیشتر و مقدار مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در ارقام روی-ناکارا و پرولین در برگ ارقام روی-کارا بیشتر بود. همچنین در شرایط کمبود روی، فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم روی-کارای بیات بیشتر از سایر ارقام بود، در حالی که در همین شرایط مقدار پراکسید هیدروژن در ارقام روی-ناکارا و مقدار فنل و آنتی‌اکسیدانت کل در ارقام روی-کارا بیشتر بود. همچنین میزان فعالیت کلیه آنزیم‌های مطالعه شده، شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و فنیل آلانین - آمونیالیاز، (غیر از پراکسیداز) و مقدار مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، فنل و آنتی‌اکسیدانت کل در برگ بیشتر از ریشه بود. به‌طورکلی می‌توان بیان کرد که فعالیت بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مورد مطالعه در شرایط کمبود روی در ارقام گندم افزایش می‌یابد و ارقام روی-کارا از فعالیت آنزیمی و مقدار پرولین بیشتر و مقدار مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن کمتری برخوردار هستند، که می‌توان از آن‌ها به عنوان شاخصی برای تشخیص ارقام روی-کارای گندم نان بهره برد.

منابع

- امیرجانی، م.ر.. عسگری، م. و عسگری، ف. ۱۳۹۳. بررسی تاثیر نانواکسید روی بر میزان آلکالوئیدها، آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و برخی شاخص‌های فیزیولوژی گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*). مجله سلوول و بافت. ۵(۲): ۱۸۳-۱۷۳.
- باغبان طبیعت، س. و رسولی صدقیانی، م.ح. ۱۳۹۱. بررسی کارایی جذب و مصرف روی در ارقام مختلف گندم در شرایط گلخانه‌ای. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. ۳(۱۰): ۳۱-۱۷.
- حجازی مهریزی، م.. شریعتمداری، ح.. خوش‌گفتارمنش، ا.ح. و معطر، ف. ۱۳۹۰. تأثیر شوری و تغذیه روی بر رشد و خواص آنتی‌اکسیدانی رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) در یک خاک آهکی. مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۷(۱): ۳۵-۲۵.
- حلیم، ق.. امام، ی و شاکری، ا. ۱۳۹۶. ارزیابی عملکرد، اجزای عملکرد و شاخص‌های تحمل به تنش در ارقام گندم نان در شرایط قطع آبیاری پس از گلدھی. مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۴(۷): ۱۳۴-۱۲۱.

- Aebi, H. 1984.** Catalase in vitro. Methods in enzymology, (105): 21-126. Academic Press.
- Bagal, U.R., Leebens-Mack, J.H., Lorenz, W.W. and Dean, J.F. 2012.** The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. BMC genomics, 13(3): 1471-2164.
- Bahari, N.B., Bahari Bighdilu, B. and Karpisheh, L. 2013.** Evaluation of drought tolerance of bread wheat genotypes by stress and sensitivity tolerance indices. Annals of Biological Research, 4(1): 43-47.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1): 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44(1): 276-287.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R. and Mansfield, J.W. 1998.** Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. Plant Physiology, 118(3): 1067-1078.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N. 2005.** The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defenses in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant Pathology, 6(6): 629-639.
- Cakmak, I. 2000.** Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. The New Phytologist, 146(2): 185-205.
- Cakmak, I. 2008.** Enrichment of cereal grains with Zinc: agronomic or genetic biofortification? Plant and Soil, 302(1-2): 1-17.
- Cakmak, I., Graham, R.D. and Welch, R.M. 2002.** Agricultural and molecular genetic approaches to improving nutrition and preventing micronutrient malnutrition globally. In: Cakmak I, Welch RM (eds) Encyclopedia of Life Support Systems. Eolss Publishers, Oxford, 1075-1099.
- Chen, W.R., He, Z.L., Yang, X.E., and Feng, Y. 2009.** Zinc efficiency is correlated with root morphology, ultrastructure, and antioxidative enzymes in rice. Journal of Plant Nutrition, 32(2): 287-305.
- Cole, C.R., Grant, F.K., Swaby-Ellis, E.D., Smith, J.L., Jacques, A., Northrop-Clewes, C.A., Caldwell, K.L., Pfeiffer, C.M., and Ziegler, T.R. 2010.** Zinc and iron deficiency and their interrelations in low-income African American and Hispanic children in Atlanta. The American Journal of Clinical Nutrition, 91(4): 1027-1034.
- D'Cunha, G.B., Satyanarayan, V., and Nair, P.M. 1996.** Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry, 42(1): 17-20.

- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., and Wichers, H.J. 2000.** Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3): 648-656.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Gupta, B., Pathak, G.C. and Pandey, N. 2011.** Induction of oxidative stress and antioxidant responses in Vigna mungo by zinc stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1): 85-91.
- Hacisalihoglu, G., Hart, J.J., Wang, Y.H., Cakmak, I., and Kochian, L.V. 2003.** Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. *Plant Physiology*, 131(2): 595-602.
- Hare, P. D., Cress, W. A., and Van Staden, J. 1998.** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21(6): 535-553.
- Hare, P. D., Cress, W. A., and Van Staden, J. 1999.** Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 50(333): 413-434.
- Haydon, M.J. and Cobbett, C.S. 2007.** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174(3): 499-506.
- Khoshgoftarmanesh, A.H., Sadrarhami, A., Sharifi, H.R., Afiuni, D. and Schulin, R. 2009.** Selecting Zinc-efficient wheat genotypes with high grain yield using a stress tolerance index. *Agronomy Journal*, 101(6): 1409.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J. and Chen, R. 2013.** Identification and characterization of the Zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biology*, 13(1): 1.
- MacAdam, J.W., Nelson, C.J. and Sharp, R.E. 1992.** Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue: I. spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiology*, 99(3): 872–878.
- Misra, A., Dwivedi, S., Srivastava, A.K., Tewari, D.K., Khan, A. and Kumar, R. 2006.** Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpenes oil(s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthtica*, 44(3): 474-477.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Journal of Plant Cell Physiology*, 22: 867-880.
- Nikitaki, Z., Hellweg, C.E., Georgakilas, A.G. and Ravanat, J.L. 2015.** Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in Chemistry*, 3: 1-15.

- Pandey, N., Gupta, B. and Pathak, G.C. 2012.** Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2): 198-205.
- Pearson, J.N., and Rengel, Z. 1997.** Mechanisms of plant resistance to nutrient deficiency stress. *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*. Basra, A. S. and Basra, R.K. (eds.). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, Vol. None shown, p. 213-240.
- Popham, P.L. and Novacky, A. 1991.** Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 96: 1157-1160.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*.
- Sharma, P.N., Kumar, P. and Tewari, R.K. 2004.** Early signs of oxidative stress in wheat plants subjected to zinc deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 27(3): 451-463.
- Singh, B., Natesan, S.K.A., Singh, B.K. and Usha, K. 2005.** Improving zinc efficiency of cereals under Zinc deficiency. *Current Science*, 36-44.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., and El-Elimat, T. 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4): 1372-1378.
- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. 2000.** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1): 59-66.
- Wissuwa, M., Ismail, A.M., and Yanagihara, S. 2006.** Effects of zinc deficiency on rice growth and genetic factors contributing to tolerance. *Plant Physiology*, 142(2): 731-741.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. and Wang, Z. 1996.** Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*, 179(2): 261-268.
- Yu, Q., Worth, C. and Rengel, Z. 1999.** Using capillary electrophoresis to measure Cu/Zn-SOD concentration in leaves of wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. *Plant Science*, 143: 231-239.

Effect of soil zinc deficiency on antioxidant enzymes activity and some biochemical parameters in bread wheat

S.M. Niazkhani¹, B. Abdollahi Mandoulakani^{2*}, M. Jafari³ and M. H. Rasouli-Sadaghiani⁴

1) Ph.D of Plants Breeding, Department of Plants Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

2 &3) Associate Professor of Department of Plants Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

4) Professor of Department of Soil Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir

This article is extracted from Ph.D thesis.

Received date: 2018.10.24

Accepted date: 2019.01.26

Abstract

In order to investigate the response of Zinc-efficient and Zinc-inefficient of bread wheat cultivars to soil Zinc (Zn) deficiency, the present factorial experiment was conducted in a greenhouse in a completely randomized design with three replications. The factors of the experiment were including Zinc levels at two conditions Zinc-adequate (five milligram Zinc per kilogram soil) and no Zinc application, Zinc-efficient cultivars (Bayat and Niknejad) and Zinc-inefficient (Hirmand and Karaj1), sampled tissues (root and leaf) and growth stage (28 days after germination and 30 percent of heading as vegetative and reproductive stages, respectively). In the present research the activity of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes and also the content of malondialdehyde, hydrogen peroxide, prolin, phenol compounds and total antioxidants were measured. The results of variance analysis and mean comparisons for main and interaction effects revealed that under Zinc deficiency conditions, the activity rate of ascorbate peroxidase enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase increased while the activity of superoxide dismutase enzymes significantly ($P \leq 0.01$) declined. The content of malondialdehyde, hydrogen peroxide, phenol and proline significantly ($P \leq 0.01$) increased under Zinc deficiency conditions. Also, the enzymes activity superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase and prolin content in Zinc-efficient cultivars were higher and whereas the amount of malondialdehyde and hydrogen peroxide were minimum in these cultivars. The rate of Catalase enzyme activity in Bayat Zinc-efficient cultivar under Zinc deficiency conditions was significantly more than that of other cultivars. In conclusion, the results of the current study demonstrated the enhanced activity of the antioxidant enzymes in bread wheat under zinc deficiency conditions.

Keywords: Bread wheat, Catalase, Proline and Zinc deficiency.