تاثیر تنش خشکی (کشت دیم) روی فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان در ژنوتیپ های پیشرفته عدس (*Lens culinaris*)

عظیم احمدی[۱]، مجید امینی دهقی[۲]، محمدحسین فتوکیان[۲]
[۱]دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهان زراعی-زراعت دانشگاه شاهد تهران
[۲]دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد
AzimAhmadi111 @yahoo.com

چکیده

برای ارزیابی ۱۲ ژنوتیپ پیشرفته عدس از لحاظ فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان، آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در شرایط دیم و کم آبیاری به عنوان عامل اصلی و ژنوتیپ‌ها به عنوان عامل فرعی در مناطق، ایستگاه تحقیقات کشاورزی اردبیل و بخش مرکزی شهرستان گرمی در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ اجرا گردید. نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده مکان نشان داد که در اردبیل میزان آنزیم پروکسیداز در بیشترین مقدار بود. در شرایط دیم آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بالاترین مقدار بودند. عملکرد دانه در شرایط دیم ۲۲ درصد کمتر از کشت کم آبی بود. بالاترین میزان آنزیم پراکسیداز مربوط به ژنوتیپ ILL6037 و مربوط به ژنوتیپ شماره (۱۲) بود. معنی‌داری اثرات متقابل مکان × ژنوتیپ نشان داد، بیشترین میزان عملکرد دانه در منطقه گرمی و ژنوتیپ شماره (۱) می‌باشد همبستگی عملکرد دانه با آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز منفی و معنی‌دار شد. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی را ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۵ در دو حالت دیم و کم آبیاری، نسبت به ژنوتیپ های دیگر داشتند.

واژه های کلیدی: فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان

مقدمه

خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که به علت تنوع زیاد و شرایط بارندگی به عنوان مهمترین عامل محدودکننده رشد و تولید گیاهان زراعی در ایران شناخته شده است (Shiranirad and Abbasian, 2011). عدس با نام علمی *Lens culinaris* از تیره لگومینوز، یکساله، روز بلند، خودگشن و دیپلویید (2n=14) با متوسط ۲۸/۵ درصد پروتئین می باشد. با وجود اینکه هنوز مکانیسم دقیق پراکسیدازها مشخص نشده است اما به نظر می رسد که آن ها نقش مهمی در دفاع گیاهان در برابر تنش‌ها داشته باشند (Kanzok, 2001). آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدان است که در کلروپلاست به دو فرم آیزوزیمی، متصل به غشای تیلاکوئید و محلول در استروما حضور دارد (Edreva, 2005). هدف از این مطالعه بررسی اثر تنش خشکی روی فعالیت آنزیمی آنتی اکسیدان در ژنوتیپ های پیشرفته عدس در شرایط دیم و کم آبیاری برای انتخاب متحمل ترین ژنوتیپ بوده است .

مواد و روش ها

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام عدس، به خشکی و شناسایی ارقام مقاوم به خشکی، ۱۲ ژنوتیپ عدس در شرایط دیم و کم آبیاری در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ به صورت کرت های خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار که عامل اصلی آبیاری در ۲ سطح (کم آبیاری و دیم) و عامل فرعی ژنوتیپ ها، در دو منطقه جداگانه ایستگاه تحقیقات کشاورزی اردبیل، و شهرستان گرمی بخش مرکزی با شرایط و اقلیم های متفاوت انجام گرفت. کشت در هر دو منطقه به صورت انتظاری، که در شهرستان گرمی در ۲۷ تا ۳۰ آذرماه اما در اردبیل در ۸ اسفندماه صورت گرفت. در تیمار کم آبیاری در هر منطقه جداگانه بسته به زمان رشد تمام کرت‌ها به طور همزمان در ۲ مرحله زمان گلدهی و مرحله پر شدن غلاف‌ها هر دفعه به میزان ۱۰ میلی متر آبیاری و در تیمار تنش یا دیم تا آخر برداشت آبیاری صورت نگرفت و فقط از نزولات باران استفاده شد. خصوصیات فیزیولوژیکی در زمان رشد و بعد ازپرشدن نیام های گیاه در هر دو تیمار آبی و تنش رطوبتی اندازه‌گیری شد:

آنزیم ها : استخراج آنزیم ها از روش (Beauchamp and Fridovich, 1971) صورت گرفت. آنزیم پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از روش (Cesar, 2010) وروش (Nakano and Asada, 1981) اندازه گیری شد.

اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی برگ

برای اندازه گیری فعالیت یا ظرفیت آنتی اکسیدانی برگ از روش (Sun et al., 2007) استفاده شد.

بعد از تست نرمال بودن داده ها، تجزیه واریانس مرکب انجام شد. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن[1] در سطح احتمال ۵٪ با نرم افزار MSTATC انجام گرفت. برای تعیین همبستگی خطی و همچنین تجزیه کلاستر از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ استفاده شد. از تجزیه خوشه ای به روش Ward و معیار فاصله اقلیدسی به منظور تعیین خویشاوندی ژنوتیپ های مورد بررسی و گروه بندی آنها براساس صفات مهم زراعی استفاده شد. برای تعیین تعداد کلاستر مناسب از روش های بیشترین گسیختگی بر اساس تغییر ناگهانی در اختلاف دو فاصله ادغام متوالی و ریشه دوم تعداد افراد استفاده گردید و صحت آنها با تابع تشخیص مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت تعداد کلاستر مناسب تعیین گردید.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس مرکب نشان داد(جدول ۱). درآنزیم پروکسیداز اختلاف معنی‌داری بین دو مکان کشت مشاهده شد. میزان آنزیم پراکسیداز بر حسب میکرو گرم آنزیم در یک گرم برگ در اردبیل در بالاترین مقدار بود (جدول۲). طبق جدول تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین دو شرایط کاشت کم آبیاری و دیم وجود داشت. به طوری که مقایسه میانگین صفات، عملکرد دانه در حالت کشت کم آبیاری، دارای بیشترین میزان بودند، ولی آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط دیم در بالاترین مقدار بود (جدول ۳). رقم بیله سوار که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود بیشترین آنزیم پراکسیداز را نسبت به سایر ژنوتیپ ها نشان داد(جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین های اثرات متقابل ژنوتیپ در مکان نشان داد که ژنوتیپ شماره ۱ در گرمی بالاترین عملکرد دانه (۱۹۰۲ کیلوگرم در هکتار) را به خود اختصاص داد. در این آزمایش تجزیه واریانس مرکب فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار نشد ولی میانگین عددی آن در شرایط کشت دیم ۵۰/۵ و در کشت کم آبیاری ۴۶/۷ بود که نشان دهنده واکنش گیاه به این شاخص در شرایط تنش رطوبتی است. ضرایب همبستگی ساده بین صفات عملکرد دانه با آنزیم آسکوربات پراکسیداز منفی و معنی دار بدست آمد (جدول ۵). فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در گیاهان باعث می‌شود که در این رقم‌ها آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدهای غشاء تحت تنش خشکی در مقایسه با سایر ارقام کاهش یابد. گیاهان دارای یک سیستم آنتی‌اکسیدانت هستند که تولید اضافی گونه‌های فعال اکسیژن را تحت شرایط

1. Duncan's multiple range test

تنش کنترل می‌کند و بنابراین آنها را در مقابل تاثیرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند و از طرف دیگر سطح مناسبی از ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) را برای رشد و مسیر انتقال پیام حفظ می‌کند (Mittler, 2002). پاسخ آنتی اکسیدانتی یک فرایند مهم برای محافظت گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسیداتیوی است که توسط یک بخش وسیعی از تنش های محیطی شامل شوری، خشکی، فلزات سنگین و سرما ایجاد می‌شود (Mittler, 2002)..

تجزیه کلاستر

جهت گروه بندی ژنوتیپ‌ها از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد بر اساس نتایج حاصله، و برش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در شرایط کم آبیاری و دیم در فاصله اقلیدسی ۴ در چهار گروه مختلف گروه‌بندی شدند. ژنوتیپ های شماره ۱ و ۵ در هر دو شرایط کشت فاصله بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ ها داشتند (شکل ۱و۲).

جدول۱- تجزیه واریانس مرکب صفات مورد بررسی در ژنوتیپ های عدس

		میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	عملکرد دانه	آنزیم پراکسیداز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز	فعالیت آنتی اکسیدانی
مکان (L)	۱	1686558.8*	0.15*	0.006 ns	124.5 ns
بلوک درون مکان R(L)	۴	250157.9 ns	3.8 ns	0.028 ns	567.6 ns
شرایط کشت (A)	۱	4329128.3**	22.2 ns	0.486*	524.6
شرایط کشت × مکان (LA)	۱	100225.5 ns	15.9 ns	0.027 ns	221.9 ns
اشتباه آزمایشی (Ea)	۴	101877.2	6.85	0.048	345.6
ژنوتیپ (B)	۱۱	383121.1**	11.2**	0.021 ns	188.1 ns
ژنوتیپ × مکان (LB)	۱۱	111467.3*	3.2 ns	0.012 ns	135.9 ns
شرایط کشت × ژنوتیپ (AB)	۱۱	39789.1 ns	3.1 ns	0.016 ns	108.1 ns
مکان × شرایط کشت × ژنوتیپ (LAB)	۱۱	67445.9 ns	3.1 ns	0.014 ns	99.9 ns
اشتباه آزمایشی (Eb)	۸۸	46626.1	2.4	0.015	123.7
ضریب تغییرات (درصد)		16.01	25.72	13.74	22.88

**، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح ۱، ۵ درصد و غیر معنی‌دار

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده مکان برای برخی صفات مورد بررسی در عدس

مکان	آنزیم پراکسیداز (میکرو گرم آنزیم در یک گرم برگ)
اردبیل	6.13 a
گرمی	6.065 b

براساس آزمون چند دامنه ای دانکن، میانگین های دارای حروف مشابه درهرستون درسطح احتمال۵ %اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند

جدول ۳- نتایج مقایسات میانگین اثرات ساده شرایط کشت برای برخی صفات مورد بررسی در عدس

مکان	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)	آنزیم آسکوربات پراکسیداز (میکرو گرم آنزیم در یک گرم برگ)
کم آبیاری	1515 a	0.21 b
دیم	1168 b	0.45 a

براساس آزمون چند دامنه ای دانکن، میانگین های دارای حروف مشابه درهرستون درسطح احتمال۵ %اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین های اثرات ساده ژنوتیپ برای برخی صفات مورد بررسی در عدس

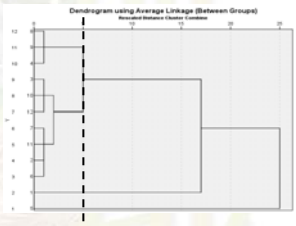
شماره ژنوتیپ	ژنوتیپ	آنزیم پراکسیداز (میکرو گرم آنزیم در یک گرم برگ)
1	ILL-2126	7.32 ab
2	ILL-9893	6.23 bc
3	ILL- 6037	8.17 a
4	FILIP-2007-11L	6.36 bc
5	ILL-2580	5.39 c
6	ILL-10023	6.03 bc
7	LOCAL CHECK	6.13 bc
8	ILL-10315	4.89 c
9	ILL-10277	4.78 c
10	ILL-465	6.14 bc
11	ILL-10721	6.39 bc
12	ILL-10837	5.27 c

براساس آزمون چند دامنه ای دانکن، میانگین های دارای حروف مشابه درهرستون درسطح احتمال۵ %اختلاف معنی داری بایکدیگرندارند.

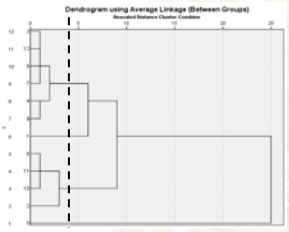
جدول ۵- همبستگی خطی برخی از صفات فیزیولوژیکی مورد برررسی در عدس

صفات	عملکرد دانه	آنزیم پراکسیداز	آنزیم آسکوبات پراکسیداز
آنزیم پراکسیداز	-0.07		
آنزیم آسکوبات پراکسیداز	-0.19*	0.22**	
فعالیت آنتی اکسیدانی	-0.11	-0.13	0.01

**، * به ترتیب معنی دار در سطح ۱، ۵ درصد



شکل۱-دندروگرام ژنوتیپ های عدس بر اساس صفات فیزیولوژیکی در شرایط کم آبیاری



شکل۲-دندروگرام ژنوتیپ های عدس بر اساس صفات فیزیولوژیکی در شرایط دیم

منابع:

1. **Beauchamp, C., and Fridovich., 1971**. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44: 276-287.
2. **Cesar, G., and C. G. Frage., 2010**. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology, John Wiley and Sons Inc.
3. **Edreva A., 2005**. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment, 106: 119-133.
4. **Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K.,Muller, H. M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. and Becker, K., 2001**. Substitution of the thioredoxin system for glutation reductase in *Drosophila melanogaster*. Science, 291: 643-646.
5. **Mittler, R., (2002)**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7: 405–410.
6. **Nakano, Y., and K. Asada., 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate – specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22: 867-880.
7. **Shiranirad, A., and A. Abbasian., 2011**. Evaluation of drought tolerance in winter rapeseed cultivars based on tolerance and sensitivity indices. Journal of Agriculture, 98: 41-48.

8. **Sun, T., Z. Xu., C. T. Wu., M. Janes., W. Prinyawiwatkul and H. K. No., 2007.** Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Caspicum annuum* L.). Food Science, 72: 98-102.

The effect of drought stress (rainfed cultivation) on enzyme activity of the antioxidant in the advanced genotypes of *Lens culinaris*

Azim Ahmadi*[1], Majid Amini Dehaghi[2], Mohammad Hossein Fotokian[2]
[1]Ph.D. student of Agronomy-Plant Physiology, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Associated professor of department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahed University
AzimAhmadi111@yahoo.com

Abstract
A split plot experiment based on randomized complete block design with 3 replications was conducted to evaluate 12 advanced genotypes of *Lens culinaris* in rainfed and low irrigation conditions as the main factors and genotypes as the secondary factors in Ardabil Agriculture Research Station and Central of Germi city during 2015-2016 cropping seasons. The results of mean composition showed that simple effects of the place had the value of peroxidase enzyme.the highest ascorbate peroxidase activity was occurred under rainfed condition. Under rainfed condition seed performance reduced by 22% compare with low irrigation condition. The maximum amount of the peroxidase enzyme was related to genotypes ILL6037 and No 12. A significant interaction effect between place and genotype was showed so that the maximum seed performance recorded for genotype No. 1 in Germi region.A significantly negative correlation was observed between seed performance and ascorbate peroxidase neg. Clustering analysis revealed that genotypes No. 1 and No. 5 had the maximum genetic distance than the other genotypes in both conditions.
Keywords: enzyme activity of antioxidant