

## تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی، مقادیر مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین محلول و نیتروژن کل برگ سویا (*Glycine max L.*)

سید محمدجواد بحرالعلومی<sup>۱\*</sup>، محمود رائینی سرجاز<sup>۲</sup>، همت‌اله پیردشتی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس آزمایشگاه شیمی و حاصلخیزی خاک، گروه علوم خاک، کارشناس ارشد هواشناسی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲. استاد گروه مهندسی علوم آب، دکترای هواشناسی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۳. دانشیار گروه زراعت، دکترای زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۰۳

### چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی گیاه سویا (رقم ساری)، در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. در این پژوهش اثر چهار تیمار آبی در یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار بررسی شد. گیاهان پس از مرحله‌ی چهار برگی به تصادف به چهار سطح آبی ۱۰۰ (شاهد،  $W_0$ )، ۶۰ (تنش ملایم،  $W_1$ )، ۴۰ (تنش میانه،  $W_2$ ) و ۲۰ (تنش شدید،  $W_3$ ) درصد آب قابل دسترس ( $AW$ ) اختصاص یافتند. در ابتدا همه تیمارها تا ۱۰۰ درصد آب دسترس آبیاری شدند و آبیاری‌های بعدی پس از رسیدن رطوبت خاک به درصد تعریف شده برای هر تیمار انجام می‌شد. در مرحله‌های زایشی  $R_4$  و  $R_5$  (۴۵ روز پس از آغاز تنش) اقدام به نمونه‌برداری برای سنجش آنزیم‌ها و نیتروژن برگ شد. یافته‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز تا ۶۰ درصد آب قابل دسترس، نسبت به شاهد ۶۵ درصد افزایش داشت. آنگاه با افزایش شدت تنش فعالیت آن کاهش یافت. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار مالون‌دی‌آلدئید ( $MDA$ ) و نیتروژن کل برگ نیز با کاهش آب خاک تا سطح ۲۰ درصد آب قابل دسترس نسبت به شاهد به ترتیب ۴۳، ۲۲ و ۲۶ درصد افزایش یافت. با کاهش ۲۰ درصدی آب قابل دسترس، مقدار پروتئین محلول برگ نسبت به شاهد ۱۲ درصد کاهش نشان داد و تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای  $W_2$  و  $W_3$  و شاهد دیده شد. نتایج گویای آن است که در تنش خشکی ملایم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت و پیامد آن، کاهش آسیب‌گونه‌های فعال اکسیژن ( $ROS$ ) بود که خود باعث نقش حفاظتی بسیار مؤثری در مراحل فتوسنتزی گیاه می‌گردد. نتیجه این سازوکار فیزیولوژیک بهبود عملکرد دانه در بوته در بازه تخلیه رطوبتی فوق بود.

واژه‌های کلیدی: آب قابل دسترس، پراکسیداز، کاتالاز، گونه‌های فعال اکسیژن

### مقدمه

کمبود آب به‌عنوان گسترده‌ترین عامل تنش محیطی همواره از جهات مختلف مورد توجه بوده و در کاهش تولید محصولات مهم زراعی چون سویا، نقش بسزایی داشته است. در مطالعات مختلف مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف (Bakaei et al., 2008)، کارایی مصرف آب (Akbari Nodehi, 2012)، مدیریت آبیاری و کود نیتروژن (Yousefi et al., 2011)، اثر خشکی بر میزان پروتئین و روغن آن (Farshbaf-Jafari et al., 2010) و ارزیابی آنتی‌اکسیدان‌ها (Masoumi et al., 2010) مورد بررسی قرار گرفته است. اکسیژن مولکولی ( $O_2$ )، در طی فرآیندهای زیستی بیشتر گیاهان و تک‌سلولی‌های فتوسنتزکننده، عامل مهم اکسیدکننده (دریافت‌کننده الکترون در زنجیره انتقال تنفسی) است و با تولید گونه‌های فعال اکسیژن ( $ROS$ )، تأثیر بسیار مهمی در واکنش‌های زیست‌شناختی و بیوشیمیایی گیاه دارد (Singh, 2003). به‌هم‌خوردگی واکنش‌های درون سلولی گیاه و ایجاد و انباشت گونه‌های فعال اکسیژن،

مورد بررسی قرار گرفته است. اکسیژن مولکولی ( $O_2$ )، در طی فرآیندهای زیستی بیشتر گیاهان و تک‌سلولی‌های فتوسنتزکننده، عامل مهم اکسیدکننده (دریافت‌کننده الکترون در زنجیره انتقال تنفسی) است و با تولید گونه‌های فعال اکسیژن ( $ROS$ )، تأثیر بسیار مهمی در واکنش‌های زیست‌شناختی و بیوشیمیایی گیاه دارد (Singh, 2003). به‌هم‌خوردگی واکنش‌های درون سلولی گیاه و ایجاد و انباشت گونه‌های فعال اکسیژن،

سویا (*Glycine max* L.) از گیاهان روغنی مهم دنیاست که در سطح چهار هزار هکتار از مزارع مازندران با تولیدی در حدود هشت هزار تن کشت می‌شود (Akbari Nodehi, 2012). در جهان از آن برای تهیه روغن‌های گیاهی و نیز تأمین پروتئین انسان و دام استفاده می‌شود (Khajehpour, 2012). تنش خشکی، جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه سویا را در مراحل رشد زایشی (R<sub>2</sub>-R<sub>6</sub>)، به شدت می‌کاهد (Fougereux et al., 1997; Daneshyan et al., 2009). از سویی مرحله گل‌دهی (R<sub>1</sub>) را بحرانی‌ترین دوره رشد سویا به تنش خشکی ارزیابی می‌کنند درحالی‌که کمبود آب در این مرحله نسبت به مراحل تشکیل و پر شدن دانه اثر کمتری بر عملکرد و اجزای عملکرد دانه سویا می‌گذارد (Desclaux et al., 2005; Karam et al., 2000). از میان ارقام سویا رقم ساری، دارای ویژگی‌های بارزتری چون تعداد غلاف و تعداد دانه در بوته برای ارزیابی تنش است (Arc-ordc, 2014). از این رو هدف این پژوهش، بررسی اثر آب قابل‌دسترس به‌عنوان شاخص مناسب از میزان آب آبیاری در تنش خشکی بر سازوکار دفاعی آنزیمی سویا و ارائه نتایج به‌صورت مدل تغییرات در نظر گرفته شد.

## مواد و روش‌ها

### مقدمات و نحوه اجرا

این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به‌صورت آزمایشی گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی برای گیاه سویا رقم ساری در چهار سطح آبی با شش تکرار انجام گرفت. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به‌کاررفته در گلدان‌ها در جدول ۱ آمده است.

در ابتدا منحنی رطوبتی خاک (تغییرات پتانسیل ماتریک نسبت به رطوبت وزنی) گلدان‌ها، به روش کاغذ صافی (Hamblin, 1981) ترسیم شد. با محاسبه میزان رطوبت در نقطه پژمردگی دائم (PWP) و ظرفیت مزرعه (FC) تنش خشکی بر پایه میزان آب قابل‌دسترس (Available Water) در چهار سطح طراحی و اجرا شد. سپس ۲۴ گلدان حاوی نه کیلوگرم خاک هواخشک تهیه و با قرار دادن ۱۲ بذر در هر گلدان، آبیاری برای تمام گلدان‌ها، سه روز در هفته انجام شد. پس از تنک کردن و انتخاب سه بوته در هر گلدان و یک ماه پس از آغاز کاشت، در مرحله چهار تا پنج گره (V<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>)، گیاهان به‌تصادف به چهار سطح آبی برای اعمال تنش اختصاص یافتند. آب گلدان‌های گیاهان شاهد (W<sub>0</sub>) نزدیک

همچون آنیون سوپراکساید (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)، پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) و رادیکال هیدروکسیل (OH) در پی تنش‌های محیطی مانند خشکی موجب آسیب سلول و اختلال در انتقال الکترون خواهد شد (Mittler, 2002; Del Rio et al., 2006). توان واکنش‌پذیری بالای رادیکال‌های اکسیژن که ناشی از الکترون‌خواهی آنان است باعث حمله به ماکرومولکول‌های گیاهی، مانند پروتئین‌ها، DNA و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Mittler et al., 2004; Edreva, 2005). در این راستا، ارزیابی مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی طی پژوهش‌های مختلف، اهمیت بررسی تنش اکسایشی را در پی داشته است (Bai and Sui, 2006). مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، شامل سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیدازها (POX) از جمله گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) می‌باشند (Sofa et al., 2015). افزون بر ترکیبات فوق، برخی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند آسکوربات (ویتامین C)، توکوفرول (ویتامین E) و کارتونیدها (بتا کاروتن) نیز نقش حفاظتی در گیاه دارند (Esfandiari et al., 2009b). رفتارهای متفاوتی از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در سطوح مختلف تنش خشکی، در برنج (Sharma and Dubey, 2005)، توتون (Ohe et al., 2005) و سویا (Masoumi et al., 2011) گزارش شده است.

برای ردیابی و ارزیابی کیفی انباشتگی و آسیب‌زایی گونه‌های اکسیژن فعال در تنش‌های اکسایشی از مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان نمایه‌ای از پاسخ گیاه به تنش استفاده می‌شود (Mates and Perez-Gomez, 1999). اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) موجود در غشاء فسفولیپیدی، بر اثر حمله ROS ها به‌ویژه OH<sup>-</sup> اکسید شده و با شکستگی زنجیره، نشت‌پذیری غشا سلول افزایش می‌یابد. فسفولیپیدها قسمت‌های بنیادی غشای سلول هستند که شیره سلولی و اندامک‌هایی همچون هسته و میتوکندری را دربر می‌گیرند، از این رو آسیب به فسفولیپیدها می‌تواند در زنده‌مانی و کارایی سلول اثرگذار باشد (Bhattacharjee and Mukherjee, 2002). یافته‌های پژوهشی اثر تنش خشکی در گیاه سویا نشان داد که با افزایش شدت تنش، مقدار مالون‌دی‌آلدئید اندازه‌گیری شده افزایش و در نتیجه میزان تخریب غشاء بیشتر شده است (Sairam and Saxena, 2002; Masoumi et al., 2011).

به ۱۰۰ درصد آب قابل دسترس نگه داشته شد. سه تیمار دیگر هنگامی که رطوبت خاک به ۶۰ (W<sub>1</sub>)، ۴۰ (W<sub>2</sub>) و ۲۰ (W<sub>3</sub>) درصد آب قابل دسترس می‌رسید مطابق جدول ۲ بازآبیاری می‌شدند. زمان مناسب آبیاری تیمارهای آبیاری با وزن کردن گلدان‌ها تعیین می‌شد.

جدول ۱. نتایج تجزیه شیمیایی و فیزیکی خاک مورد آزمایش

Table 1. Results of chemical and physical analysis of studied soil

هدایت الکتریکی		ماده آلی	نیترژن	پتاسیم قابل جذب	فسفر قابل جذب
بافت خاک	(شوری)	O.M. (%)	N (%)	K <sub>av.</sub>	P <sub>av.</sub> (mg/kg)
Soil texture	pH	EC (dS/m)			
لوم سیلتی رسی Silty clay loam	7.5	0.69	4.04	25.05	416.4

جدول ۲- ظرفیت مزرعه، نقطه پژمردگی، پتانسیل ماتریک، رطوبت جرمی، مقدار آب قابل دسترس و حجم آب آبیاری در سطوح مختلف تنش

Table 2. Field capacity, wilting point, matric potential, mass moisture, available water quantity and irrigation water volume at different stress levels

وضعیت رطوبت خاک گلدان‌ها Soil moisture contents in pots	پتانسیل ماتریک Matric Potential (bar)	رطوبت جرمی Mass Moisture (%)	آب قابل دسترس Available Water (ml)	جرم خاک و رطوبت در هنگام آبیاری Soil and moisture content when irrigated (gr)	حجم آب در هر بار آبیاری Irrigation water volume (ml)
ظرفیت مزرعه Field Capacity (FC)	0.20-0.30	27.0	1000	11050	-
۱۰۰ درصد AW 100% AW (W0)	0.20-0.40	25.8-27.0	900-1000	10950-11050	100-200
۶۰ درصد AW 60% AW (W1)	0.66	22.5	600	10660	400-500
۴۰ درصد AW 40% AW (W2)	1.74	20.0	400	10440	600-700
۲۰ درصد AW 20% AW (W3)	5.25	17.5	200	10225	800-900
نقطه پژمردگی دائم Permanent Wilting Point (PW)	15.00	15.4	0	10040	-

اسفندیاری و همکاران (Esfandiari et al., 2009a)، با ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی و افزودن ۱/۸ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات‌دی‌هیدروژن پتاسیم (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ انجام گرفت. در این روش پس از تهیه سوسپانسیون گیاه و بافر و سانتریفیوژ آن، بخش بالایی محلول جدا و برای اندازه‌گیری کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین محلول استفاده شد.

#### نمونه‌برداری و استخراج اولیه آنزیمی

پس از ۴۵ روز از آغاز تنش و رسیدن گیاه به مرحله زایشی R<sub>4</sub> الی R<sub>5</sub>، سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز آغاز شد. برای این کار، از هر گلدان نمونه‌های برگ برداشت و با قرار دادن در تانک‌های ویژه حاوی نیترژن مایع، بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. استخراج آنزیمی به روش

### اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز

$A_{600}$  محاسبه و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی ۱۵۵  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  و مقدار پروتئین محلول برگ مقدار مالون‌دی‌آلدئید برحسب واحد نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین محلول ( $\text{nmol/mg pro.}$ ) گزارش شد.

### اندازه‌گیری نیتروژن کل برگ

جهت اندازه‌گیری نیتروژن کل برگ، نمونه‌ها پس از شستشو و خشک نمودن در ۷۰ درجه سانتی‌گراد، آسیاب و الک شدند. مراحل هضم، تقطیر و تیتراسیون به روش کج‌دال و بر اساس دستورالعمل شرکت فاس (Foss Tecator AB, 2001) با دستگاه اتوماتیک FOSS Kjeltec 2300 انجام شد و مقدار نیتروژن برحسب درصد وزن خشک گیاه محاسبه گردید.

### اندازه‌گیری عملکرد

با زرد شدن حدود ۹۵٪ از برگ‌ها و قهوه‌ای شدن کامل غلاف‌ها، در مرحله R<sub>8</sub> برداشت غلاف از بوته‌ها انجام شد. سپس دانه‌ها از غلاف خارج و مجموع وزن دانه‌ها در بوته‌های هر گلدان توزین گردید. میانگین وزن دانه در بوته برای هر گلدان به‌عنوان شاخص عملکرد لحاظ گردید.

در پایان و پس از آزمون نرمال بودن، داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (HSD) و در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

### نتایج و بحث

#### کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که کاهش آب قابل‌دسترس بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تأثیر معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) داشته است. فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش تنش خشکی تا سطح ۶۰ و ۴۰ درصد آب قابل‌دسترس، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد (۱۰۰ درصد آب قابل‌دسترس) افزایش یافت (شکل ۱). معادله منحنی تغییرات، بیشترین فعالیت را در حدود ۵۹ درصد آب قابل‌دسترس نشان می‌دهد. روند تغییرات نمایانگر آن است که با افزایش تنش و کاهش رطوبت خاک، بر میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزوده شده است. با کاهش آب قابل‌دسترس به ۲۰ درصد ( $W_3$ )، فعالیت آنزیم کاتالاز افت

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش آبی (Aebi, 1984)، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر برحسب واحد فعالیت (U) که برابر با میکرومول تجزیه پراکسید هیدروژن است اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از تغییرات جذب ( $\Delta A = A_{60} - A_0$ ) دستگاه اسپکتروفتومتر، ضریب خاموشی  $0.28 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  برای پراکسید هیدروژن، حجم محلول‌های آنزیمی، پراکسید هیدروژن، بافر بکار رفته در واکنش و مقدار پروتئین محلول، مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز، برحسب واحد فعالیت بر میلی‌گرم پروتئین محلول در دقیقه ( $U/\text{mg pro. min}$ )، محاسبه شد.

### اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش تانگ و نیوتن (Tang and Newton, 2005)، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان‌های صفر و ۶۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. با استفاده از تغییرات جذب ( $\Delta A = A_{60} - A_0$ ) دستگاه اسپکتروفتومتر، ضریب خاموشی  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  برای تترآگایاکول، حجم محلول‌های آنزیمی، پراکسید هیدروژن، بافر و گایاکول بکار رفته در واکنش و مقدار پروتئین محلول، مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز برحسب واحد فعالیت بر میلی‌گرم پروتئین محلول در دقیقه ( $U/\text{mg pro. Min}$ ) محاسبه شد.

### اندازه‌گیری پروتئین محلول

برای سنجش پروتئین محلول در برگ، پس از تهیه استانداردها و افزایش معرف، میزان جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر به روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد و سپس منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید. اندازه‌گیری جذب محلول‌های استخراج‌شده آنزیمی هر نمونه با معرف نیز انجام و مقدار پروتئین محلول برحسب واحد میلی‌گرم پروتئین محلول به گرم وزن تر گیاه ( $\text{mg pro./g plant}$ ) محاسبه شد.

### اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدئید به روش استوارت و بیلی (Stewart and Bewley, 1980) در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر انجام و مقدار  $\Delta A_{532}$

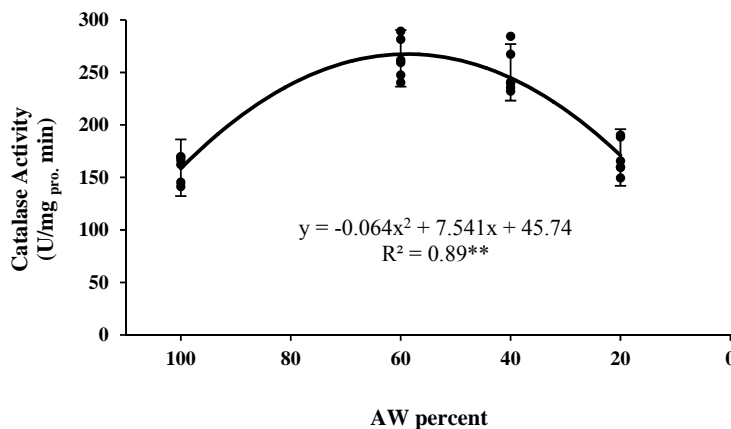
کرد هرچند تفاوت معنی‌داری میان آن با فعالیت در تیمار شاهد دیده نشد. افزایش فعالیت کاتالاز در تنش ملایم و افت آن در تنش شدید ( $W_0 < W_3 < W_2 < W_1$ ) با نتایج معصومی و همکاران (Masoumi et al., 2010) در سویا، با استفاده از تشتک تبخیر در زمان آبیاری مجدد، همسو بوده است.

جدول ۳. تجزیه واریانس آنزیم‌های اکسیدان‌های آنزیمی، مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین محلول در برگ، نیتروژن کل برگ و وزن دانه در بوته  
Table 3. Analysis of variance of antioxidant enzymes, MDA, leaf solution protein, leaf total nitrogen and Seed weight per plant

Sources of variation	درجه آزادی	Mean Squares (MS)			میانگین مربعات (MS)		
		فعالیت آنزیم کاتالاز Catalase activity	فعالیت آنزیم پراکسیداز Peroxidase activity	مالون‌دی‌آلدئید MDA	پروتئین محلول برگ Leaf soluble protein	نیتروژن کل برگ Leaf total Nitrogen	وزن دانه بوته Seed weight per plant
آب قابل‌دسترس Available water	3	17445.7**	266.1**	1.79*	0.84*	0.724**	42.9**
خطای آزمایش Experimental error	20	308.8	10.2	0.55	0.20	0.034	1.7
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	8.4	7.1	11.6	6.6	5.4	12.4

\*\* و \* معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

\*\* and \* indicates significance differences at 1 and 5 percent



شکل ۱. اثر آب قابل‌دسترس خاک بر فعالیت آنزیم کاتالاز

Fig. 1. The effect of soil available water on catalase enzyme activity

گیاه ذرت برای سطوح ۱۰۰، ۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد آب قابل‌دسترس، روند تغییرات فعالیت کاتالاز کاملاً افزایشی بود (Manoochehrifar et al., 2011) و بیشترین فعالیت در تیمار ۴۰ درصد آب قابل‌دسترس به دست آمد. چنین افزایش فعالیت برای سویا (Khoshouee et al., 2011) نیز گزارش شده است.

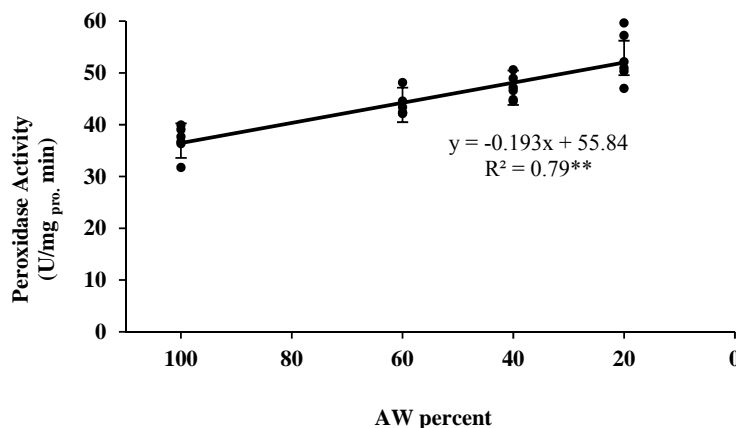
کاهش فعالیت این آنزیم در تنش‌های شدید شاید به دلیل ناکارآمدی سامانه دفاعی آنزیمی سویا در شدت‌های بالا باشد (Masoumi et al., 2010). پاسخ دفاعی دیگر گیاهان به تنش خشکی در گزارش‌های دیگر پژوهشگران نمایشگر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با افت آب خاک است، گرچه در این پژوهش‌ها از تنش بسیار شدید ۲۰ درصد آب قابل‌دسترس استفاده نشد، به طوری‌که در پژوهشی مشابه در

## پراکسیداز

کاهش آب قابل دسترس بر فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) بود (جدول ۳). فعالیت این آنزیم با افزایش تنش خشکی روندی کاملاً افزایشی داشت ( $W_0 < W_1 < W_2 < W_3$ ) و درصد فعالیت آن نسبت به تیمار شاهد با افت آب خاک به ترتیب ۱۸/۷، ۲۷/۹ و ۴۳/۴ درصد افزایش یافت. تأثیر سطوح خشکی بر فعالیت این آنزیم در سویا در گزارش معصومی و همکاران (Masoumi et al., 2010)، همانند اثر کاتالاز بود و با افزایش شدت تنش، فعالیت در آغاز افزایشی و سپس کاهش می‌شد در حالی که در یافته‌های این پژوهش با افت آب خاک این روند افزایشی باقی ماند (شکل ۲).

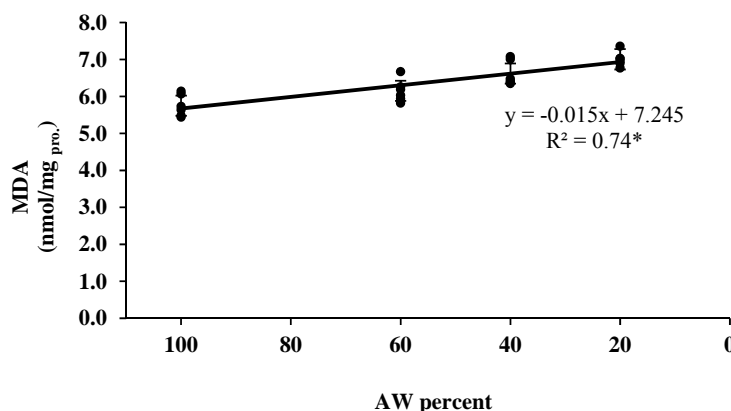
## مالون‌دی‌آلدئید

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر تنش خشکی بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید، معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). شکل ۳ نشان می‌دهد با افزایش تنش خشکی در سویا مقدار مالون‌دی‌آلدئید روندی افزایشی داشت، به گونه‌ای که نسبت به تیمار شاهد مقدار آن به ترتیب ۷، ۱۵ و ۲۲ درصد در ۶۰، ۴۰ و ۲۰ درصد آب قابل دسترس افزایش یافت، گرچه در تنش‌های ملایم تفاوت معنی‌داری با شاهد دیده نشد. رابطه منفی و معنی‌داری نیز میان درصد آب خاک و مقدار مالون‌دی‌آلدئید دیده شد.



شکل ۲. اثر آب قابل دسترس خاک بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

Fig. 2. The effect of soil available water on peroxidase enzyme activity



شکل ۳. اثر آب قابل دسترس خاک بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید

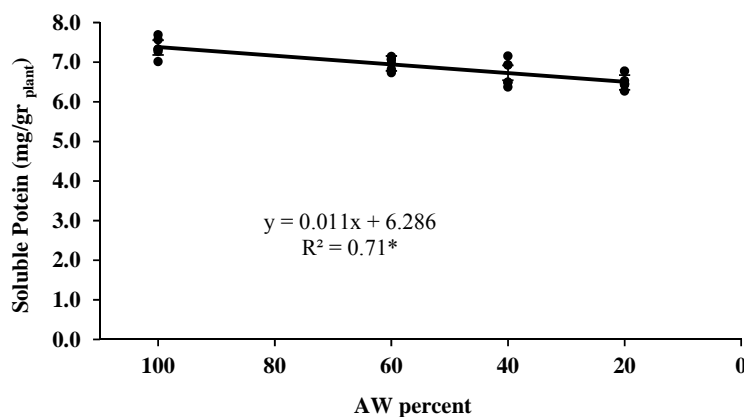
Fig. 3. The effect of soil available water on malon dialdehyde content.

and et al., 2011). از این رو افزایش مقدار MDA در پژوهش حاضر نمایشگر آسیب اکسایشی در بافت‌های گیاهی است که با یافته‌های سایرام و ساکسنا (Sairam and Saxena, 2002) در تنش خشکی و نصیبی و همکاران (Nasibi et al., 2014) در تنش شوری همسو است.

#### پروتئین محلول برگ

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر تنش خشکی بر مقدار پروتئین‌های محلول در برگ کل معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). میانگین پروتئین‌های محلول در برگ سویا با کاهش آب قابل دسترس دارای روندی نزولی بود به گونه‌ای که تیمارهای ۴۰ و ۲۰ درصد آب قابل دسترس در مقایسه با تیمار شاهد (۱۰۰ درصد AW) به میزان ۹ و ۱۲ درصد کاهش یافت (شکل ۴).

پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی، همچون خشکی علاوه بر عملکرد، در سطح سلولی با تولید ترکیباتی چون مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، قابل بررسی است. مالون‌دی‌آلدئید به‌طور طبیعی در گیاهان تولید می‌شود و مقدار آن با شکست و جدایی اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است. افزایش تولید آن پیامد ویرانی اسیدهای چرب دیواره سلول است (Moussa and Abdel-Aziz, 2008). از این رو مقدار MDA می‌تواند نمایه مناسبی برای پراکسیدشدگی چربی‌ها باشد. یکی از پیامدهای همه تنش‌های محیطی افزایش گونه‌های فعال اکسیژن است. انباشتگی این گونه‌ها باعث تولید بیشتر MDA می‌شود که یکی از فرآورده‌های نهایی پراکسیدشدگی چربی‌های دیواره سلول و نمایه‌ای از شدت تنش اکسایشی است (Zhang et al., 2010; Cuypers



شکل ۴- اثر آب قابل دسترس بر مقدار پروتئین محلول برگ

Fig. 4. The effect of soil available water on leaf soluble protein content

(Dolatabadian et al., 2009), جو (Amini et al., 2009) و گندم (Ranjan et al., 2001; Tale-Ahmad and Haddad, 2010) چنین روندی برای پروتئین‌های محلول در برگ بر اثر تنش خشکی گزارش شد.

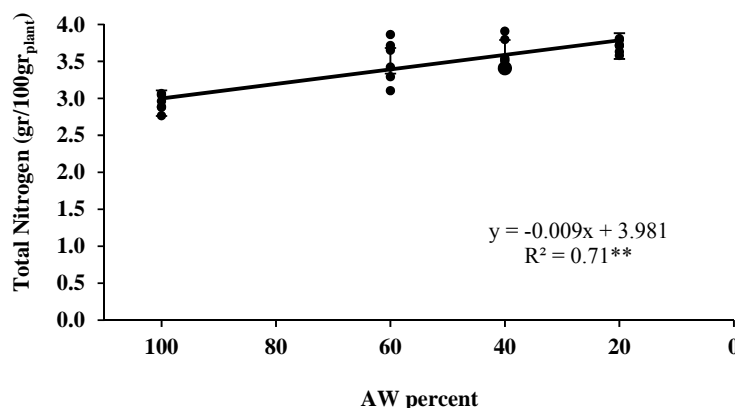
#### نیترोजن کل برگ

اثر تیمار خشکی بر میانگین نیترोजن کل برگ نیز معنی‌دار بود (جدول ۳). مقدار نیترोजن در تیمار شاهد

افت پروتئین‌های محلول در برگ با کاهش آب قابل دسترس قابل توجه است. بخشی از پروتئین‌ها که درصد کمی از پروتئین کل در گیاه را تشکیل می‌دهد به دلیل ساختار فرمولی متفاوت در مقایسه با پروتئین‌های دیگر، قابلیت انحلال بیشتری دارند. حلالیت بالا و استحکام پایین ساختاری این پروتئین‌ها باعث مقاومت کمتر و در نتیجه آسیب بیشتر در برابر میل واکنش‌پذیری بالای گونه‌های فعال اکسیژن در اثر افزایش شدت تنش می‌شود (Singh, 2003). همسو با یافته‌های این پژوهش در گیاه دارویی کدو پوست- کاغذی (Naeemi et al., 2012)، برگ ذرت

در محیط‌های کم‌باران در مقایسه با گیاهان روییده در مناطق پر باران، دارای نیتروژن برگ بیشتری بودند دلیل این امر افزایش مقدار نیتروژن نسبت به کاهش وزن گیاه به واسطه کمبود آب ذکر شد، از این رو کارایی جذب نیتروژن برگ در شرایط خشک‌سالی و کم‌آبایی افزایش یافت که این می‌تواند بهره‌فوت‌سنتر در واحد سطح برگ را افزایش دهد (Raeini-Sarjaz and Chalavi, 2008). در راستای یافته‌های این پژوهش گزارش‌هایی در زمینه اثر تنش خشکی در افزایش مقدار نیتروژن در گندم (Polshakan-e Pahlavan et al., 2007)، ذرت (Majidiyan et al., 2008) و کلزا (Nasri and Khalatbari, 2009) نیز منتشر شده است.

( $W_0$ ) در مقایسه با تیمارهای تنش خشکی کم بود (شکل ۵) و با افت آب خاک مقدار نیتروژن بین ۱۹ تا ۲۶ درصد افزایش یافت. همچنین در شکل مذکور، میان درصد آب خاک و مقدار نیتروژن کل برگ رابطه منفی و معنی‌داری مشاهده شد. افزایش نیتروژن برگ لوبیا سبز بر اثر تنش آبی نیز گزارش شده است (Raeini-Sarjaz and Chalavi, 2008). دلیل این افزایش به خاطر ثابت بودن مصرف کودهای نیتروژنه در تیمارهای مختلف آبی، تفاوت شاخص سطح برگ بیان شد چون گسترش برگ در گیاهان با آب قابل‌دسترس مناسب، بیشتر از گیاهان تحت تنش است. در یک بررسی جامع (Wright et al., 2003) نیز مشاهده شد که گیاهان روییده



شکل ۵. اثر آب قابل‌دسترس خاک بر مقدار نیتروژن کل برگ

Fig. 5. The effect of soil available water on leaf total nitrogen content

عملکرد تا سطح  $W_1$  دانست. با نگاهی به مقادیر وزن دانه در سطوح  $W_2$  و  $W_3$ ، به وضوح کاهش شدید عملکرد محصول در خشکی‌های متوسط و شدید مشهود است که به شدت تحت تأثیر کاهش آب قابل‌دسترس قرار گرفت و کاهش ۳۱ و ۴۱ درصدی وزن دانه در بوته را نسبت به سطح  $W_1$  به همراه داشت.

پژوهشگران صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی سویا را در تنش خشکی بسیار مورد بررسی قرار دادند. برای نمونه، می‌توان به کاهش تعداد غلاف، دانه، وزن و عملکرد دانه (Akbari Nodehi, 2012; Masoumi et al., 2011) تحت تنش خشکی اشاره کرد. کاهش عملکرد دانه در نتیجه تنش خشکی و افزایش فواصل آبیاری توسط اوهاشی و همکاران (Ohashi et al., 2009) نیز گزارش شده است. در این

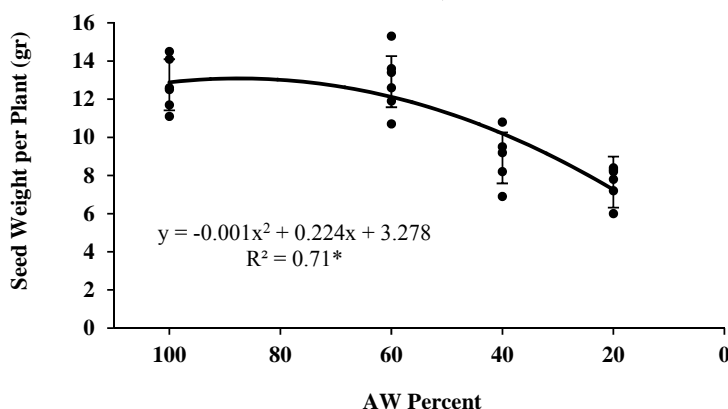
#### وزن دانه در بوته

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر مقدار آب قابل‌دسترس بر وزن دانه در بوته در سطح یک درصد ( $P \leq 0.01$ ) معنی‌دار گردید. با توجه به بررسی عملکرد ارقام سویا، آن را گیاهی نیمه‌مقاوم به تنش خشکی می‌دانند (Bakaei et al., 2008; Vahdi and Gholinezhad, 2015) در این پژوهش معادله تغییرات وزن دانه در بوته نسبت به  $AW$  (شکل ۶) بیانگر این مطلب است که بازه رطوبتی  $FC$  تا ۶۰ درصد آب قابل‌دسترس، مناسب‌ترین حالت در تأمین نیاز آبی گیاه سویا است که مساعدترین شرایط را از لحاظ حداکثر عملکرد محصول در پی دارد. همچنین می‌توان کارآمدی آنتی‌اکسیدان‌ها در حفاظت از فرایندی فتوسنتزی را به‌عنوان عامل مؤثری در میزان



اصلی زایشی) و وزن دانه‌ها (به دلیل کاهش انتقال اسیمیلات و فتوسنتز جاری) عنوان شده است.

گزارش دلایل عمده کاهش عملکرد گیاهان در شرایط تنش‌های کم‌آبی، کاهش ارتفاع دوره رشد، کاهش سطح اندام اصلی فتوسنتز کننده (برگ)، کاهش تعداد گل‌ها (اندام‌های



شکل ۶. اثر آب قابل دسترس خاک بر مقدار وزن دانه در بوته

Fig. 6. The effect of soil available water on seed weight per plant

شدید، کاهش آب برگ ناشی از کم شدن آب قابل دسترس باعث افزایش غلظت نیتروژن در واحد وزن گیاه و کاهش محسوس وزن دانه شد. مقایسه کمی فعالیت کاتالاز و پراکسیداز نشان می‌دهد میزان فعالیت کاتالاز در تجزیه و بی‌اثر کردن ROS ها بیشتر از پراکسیداز بود با آنکه در تنش‌های شدید از کارایی کاتالاز کاسته و بر فعالیت پراکسیداز افزوده شد کاتالاز همچنان مقدار بیشتری داشت.

#### سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری و راهنمایی‌های ارزنده کارشناسان گروه‌های زراعت و علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می‌کنند.

#### نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش بیانگر آن است که سامانه دفاعی سویا همانند دیگر گیاهان بررسی شده، برای کاهش اثر ثانویه تنش‌های محیطی، تنش آکسایدگی، بسیار فعال است. گرچه در تنش‌های بسیار شدید از فعالیت آنزیم کاتالاز در خنثی‌سازی اثر ROS ها در برگ سویا کاسته شد اما تا تنش ملایم تمام آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از خود روندی افزایشی را نشان داده که خود بازگوکننده عدم اختلال گونه‌های اکسیژن فعال و مهار آن بوده و افزایش عملکرد را در پی داشته است. علی‌رغم افزایش فعالیت پراکسیداز، به دلیل کاهش شدید فعالیت کاتالاز در تنش‌های شدید، آنتی‌اکسیدان‌ها نتوانستند نقش حفاظتی مؤثری در کاهش آسیب به اسیدهای چرب غشاء یاخته‌ای و پروتئین محلول برگ داشته باشند. در تنش‌های

#### منابع

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- Akbari Nodehi, D., 2012. Effect of drought stress at different growth stages on soybean yield and water use efficiency in Mazandaran. *Agricultural Science and Sustainable Production*. 22(1), 13-23. [In Persian with English Summary].
- Amini, Z., Haddad, R., Moradi, F., 2009. The effect of water deficit stress on antioxidant enzymes during generative growth stages in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*. 12(46), 65-74. [In Persian with English Summary].

- Arc-ordc, Oilseeds research and development company, 2014. From <http://arc-ordc.ir/index.php/joomla-pages/joomla-content>.
- Bakaei, A.S., Babaei, H.R., Habibi, D., Javidfar, F., Mohammadi, A., 2008. Evaluation of different soybean (*Glycine max* L.) genotypes under drought stress conditions. Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding. 4(1), 27-38. [In Persian with English Summary].
- Bai, L., Sui, F., 2006. Effect of soil drought stress on leaf of maize. Pedosphere. 16, 326-332.
- Bhattacharjee, S., Mukherjee, A.K., 2002. Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. Seed Science and Technology. 30, 279-287.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.
- Cuyper, A., Smeets, K., Ruytinx, J., Opdenakker, K., Keunen, E., Remans, T., Horemans, N., Vanhoudt, N., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in Arabidopsis thaliana seedlings. Journal of Plant Physiology. 168, 309-316.
- Daneshyan, J., Hadi, H., Jonubi, P., 2009. The study effect of amount of soil water on quantity and quality characteristics of soybean. Proceedings of the National Conferences about Oilseed Plant in Iran, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [In Persian].
- Del Rio, L., Sandalio, L., Corpas, F., Palma, J., Barroso, J., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in paroxysms, production, scavenging and role in cell signaling. Plant Physiology. 141, 330-335.
- Desclaux, D., Huynh, T.T., Roumet, P., 2000. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. Crop Science. 40, 716-722.
- Dolatabadian, A., Modarres Sanavy, S.A.M., Sharifi, M., 2009. Effect of water deficit stress and foliar application of ascorbic acid on antioxidants enzymes activity and some biochemical's changes in leaves of grain corn (*Zea maize* L.). Iranian Journal of Biology. 22(3), 407-421. [In Persian with English Summary].
- Edreva, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment. 106, 119-133.
- Esfandiari, E., Alavi-Kia, S.S., Bahmani, A., Aazami, M.A., 2009a. The effect of light on ROS scavenging systems and lipid peroxidation under cold conditions in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Agricultural Research. 4, 378-382.
- Esfandiari, E., Shakiba, M.R., Mahboob, S.R., Alyari, H., Baradaran Firozabadi, M., 2009b. Effect of water stress on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of wheat seedlings. Journal of Agricultural Science (University of Tabriz). 19(2), 129-147. [In Persian with English Summary].
- Farshbaf-Jafari, S., Ghasemi-Golozani, K., Shafagh-Kalvanagh, J., 2010. Effects Pre-treatment and drought stress on the percentage and yield of oil and soybean protein. Proceedings of the 3rd International Seminar on Oilseeds and Edible Oils, Tehran, Iran. [In Persian with English Summary].
- Foss Tecator AB., 2001. The Determination of nitrogen according to kjeldahl using block digestion and steam distillation. AN300.
- Fougereux, J., Dore, A., Ladonne, T., Fleury, A., 1997. Water stress during reproductive stages affects seed quality and yield of pea (*Pisum sativum* L.). Crop Science. 37, 1247-1252.
- Gill, S. S., Tuteja, N., (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48, 909-930.
- Hamblin, A. P., 1981. Filter-paper method for routine measurement of field water potential. Journal of Hydrology. 53, 355-360.
- Karam, F., Masaad, R., Sfeir, T., Mounzer, O., Roupael. Y., 2005. Evapotranspiration and seed yield of field grown soybean under deficit irrigation conditions. Agricultural Water Management. 75(3), 226-244.
- Khajehpour, M. R., 2012. Industrial Plants. Jahad Daneshgahi Press (Isfahan University of Technology). 562p. [In Persian].
- Khoshouee, S., Zarghami, R., Mashhadi Akbar Boojar, M., Tarighaleslami, M., 2011. Effect of water deficiency and plant density on yield and some physiologic and biochemical traits of two soybean cultivars (*Glycine max* L.) in Varamin-Iran. Proceedings of the first National

- conference of Modern Agricultural Science and Technology (MAST). [In Persian with English Summary].
- Majidian, M., Ghalavand, N.A., Kamkar-e Haghghi, A.A., 2008. Effects of nitrogen different amounts, manure and irrigation water on yield and yield components of corn. *Electronic Journal of Crop Production*. 1(2), 67-85. [In Persian with English Summary].
- Manoochehrifar, P., Lari Yazdi, H., Zaji, B., 2011. The effect of salicylic acid on activities of catalase and peroxidase in 7 days seedlings of *Zea mays* under drought stress. *Proceedings of the 1st National Conference on New Concepts in Agriculture*. Islamic Azad University, Saveh Branch. [In Persian with English Summary].
- Masoumi, H., Masoumi, M., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadian, G., Habibi, D., 2010. Changes in several enzymes activity and seed yield by water deficit stress in soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanicae Cluj-Napoca*. 38(3), 86-94.
- Masoumi, H., Darvish, F., Daneshin, J., Nourmohammadi, G., Habibi, D., Pourtaghi, A., Masoumi, M., 2011. Effect of water deficit on activities of antioxidants and lipid peroxidation in five soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Proceedings of the 1st National Conference on New concepts in Agriculture*. Islamic Azad University, Saveh Branch. [In Persian with English Summary].
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., 1999. Antioxidant enzymes and human disease. *Chemical Biochemistry*. 32(8), 595-603.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F. Y., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9, 490-498.
- Moussa, H., Abdel-Aziz, S. M., 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*. 1(1), 31-36.
- Naeemi, M., Ali Akbari, G., Shirani Rad, A. H., Hassanloo, T., Abbas Akbari, G., 2012. Effect of zeolite application and selenium spraying on water relations traits and antioxidant enzymes in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Crops Improvement*. 14(1), 67-81. [In Persian with English Summary].
- Nasibi, F., Manouchehri Kalantari, K., Barand, A., 2014. Effects of seed pre-treatment with L-arginine on improvement of seedling growth and alleviation of oxidative damage in canola plants subjected to salt stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 5(1), 1217-1224. [In Persian with English Summary].
- Nasri, M., Khalatbari, V., 2009. The effect of water stress on changes in microelements on physiological aspects of rapeseed cultivars (*Brassica napus*). *Iranian Journal of Dynamic Agricultural*. 6(1), 81-91. [In Persian with English Summary].
- Pol Shekan-e Pahlavan, M.R., Movahedi Naeini, S.A.R., Eatesam, G.R., Keykha, G., 2007. Wheat plant growth and yield with different planting systems and irrigation frequency 2-soil and plant nutrients. *Agricultural Sciences and Natural Resources*. 14(5), 23-34. [In Persian with English Summary].
- Ohashi, Y., Nakayama, N., Saneoka, H., Mohapatra, P.K., Fujita, K., 2009. Differences in the responses of stem diameter and pod thickness to drought stress during the grain filling stage in soybean plants. *Acta Physiologicae Plantarum*. 31(2), 271-277.
- Ohe, M., Rapolu, M., Mieda, T., Miyagawa, Y., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Shigeoka, S., 2005. Decline in leaf photooxidative stress tolerance with age in tobacco. *Plant Science*. 168, 1487-1493.
- Raeni-Sarjaz, M., Chalavi, V., 2008. Effects of diverse microclimates and soil water contents on water-use efficiency and carbon isotope discrimination for bush bean. *Journal Agricultural Science Technology*. 10, 43-53.
- Ranjan, R., Bohra, S. P., Jeet, A. M., 2001. *Plant Senescence Physiological, Biochemical and Molecular Aspects*. Jodhpur Agrobios. New York. Pp. 18-42.
- Sairam, R.K., Saxena, D.C., 2002. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal Agronomy Crop Science*. 184, 55-61.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 46, 209-221.

- Singh, D.P., 2003. Stress Physiology. New Age International. 188p.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A., 2015. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Science. 16, 13561-13578.
- Stewart, R.R.C., Bewley, J.D., 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. Plant Physiology. 65, 245-248.
- Tale-Ahmad, S., Haddad, R., 2010. Effect of silicon on antioxidant enzymes activities and osmotic adjustment contents in two bread wheat genotypes under drought stress conditions. Seed and Plant Production. 26(2), 207-225. [In Persian with English Summary].
- Tang, W., Newton, R.J., 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Plant Physiology Biochemistry. 43, 760-769.
- Vahdi, N., Gholinezhad, E., 2015. Evaluation of drought tolerance of some soybean cultivars. Journal of Water Research in Agriculture. 29(1), 1-9. [In Persian with English Summary].
- Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., 2003. Least-cost input mixtures of water and nitrogen for photosynthesis. American Naturalist. 161, 98-111.
- Yousefi, S. M., Amiri, E., Paknejad, F., Elkaee, M., 2011. Effect managements of irrigation and nitrogen manure on yield and yield components of soybean. Proceedings of the 1st National Conference on New Concepts in Agriculture. Islamic Azad University, Saveh Branch. [In Persian with English Summary]
- Zhang, X.H., Shen, L., Li, F.J., Zhang, Y.X., Meng, D.M., Sheng, J. P., 2010. Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. Journal of Science, Food and Agriculture. 90, 2195-2202.