



## تعیین غلظت بهینه سه آنزیم اکسیدان برای افزایش مقاومت به خشکی ماش (*Vigna radiata* L.) با استفاده از الگوریتم ژنتیک

شمس‌الدین اسکندر نژاد<sup>۱</sup>،\* منوچهر قلی‌پور<sup>۲</sup> و حسن مکاریان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه صنعتی شاهرود،

<sup>۲</sup>دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه صنعتی شاهرود

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** در اثر تنش خشکی، میزان رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و گیاه دچار تنش اکسیداتیو می‌گردد. گیاه با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز (متغیرهای مستقل یا تأثیرگذار؛  $X_s$ ) رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و خود را از آسیب محافظت می‌کند (مقاومت به تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی). تأثیر این محافظت، در صفاتی مثل رشد و تولید دانه (به ترتیب عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت؛ متغیرهای وابسته یا تأثیرپذیر؛  $Y_s$ ) منعکس می‌شود. با حداکثر نمودن تابع  $Y_s$  نسبت به  $X_s$ ، می‌توان ترکیبی از  $X_s$ ها را به دست آورد که بالاترین مقدار ممکن  $Y_s$  حاصل گردد. اساس این بهینه‌سازی، روابط مبتنی بر تغییرات ایجاد شده در  $X_s$  و  $Y_s$  بر اثر تنش خشکی می‌باشد. به لحاظ این که تعداد  $Y_s$  در اینجا بیش از یک می‌باشد، رابطه موجود از نوع چند متغیره بوده و از پیچیدگی‌های بالایی برخوردار است به‌ویژه این که بین متغیرهای  $Y_s$  همبستگی مثبت قوی (همبستگی بزرگتر از  $+0/95$ ) به دست نیامد. در این شرایط، استفاده از الگوریتم ژنتیک می‌تواند بر فایده آمدن بر این پیچیدگی کمک نماید. خروجی این الگوریتم می‌تواند مورد استفاده متخصصان اصلاح نباتات قرار بگیرد. به بیان دیگر، اصلاح‌گران می‌توانند با دستکاری ژنتیکی گیاه در جهت فعالیت بهینه  $X_s$ ، مقاومت به خشکی را افزایش دهند. هدف از این آزمایش، انجام بهینه‌سازی مذکور در ماش بود.

**مواد و روش‌ها:** به‌منظور دقت آزمایش در اعمال تنش خشکی و از طرف دیگر افزایش تعمیم‌پذیری نتایج به شرایط مزرعه، در این بررسی از آزمایش گلدانی در هوای آزاد استفاده شد. گنجایش گلدان‌ها پنج کیلوگرم خاک بود که در هر کدام، پنج عدد بذر ماش (لاین VC1973a) کشت شد. پس از تنک کردن، دو گیاه در هر گلدان باقی ماند. پس از محاسبه ظرفیت زراعی خاک با استفاده از روش وزنی، چهار سطح کم آبیاری با سه تکرار شامل ۸۰ درصد (شاهد)، ۶۵ درصد، ۵۰ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی اعمال گردید. در زمان گل‌دهی، غلظت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز ( $X_s$ ) برآورد گردید. بعد از رسیدگی گیاه، شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی ( $Y_s$ ) اندازه‌گیری شدند. برای حداکثر کردن تابع، ابتدا تابع مطلوبیت جزئی محاسبه گردید. سپس تابع

\*مسئول مکاتبه: [manouchehr.gholipoor@gmail.com](mailto:manouchehr.gholipoor@gmail.com)

مطلوبیت کل به دست آورده شد. با استفاده از نرم‌افزار متلب و در قالب الگوریتم ژنتیک، مقادیری از  $Xs$  که برای آن، بالاترین  $Ys$  حاصل می‌گردد، محاسبه شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تابع برخوردار از هفت مؤلفه از ضریب تبیین بالایی برخوردار بود و توانست به خوبی ارتباط  $Ys$  را با  $Xs$  پیش‌بینی نماید. ضریب رگرسیونی استاندارد به دست آمده برای کاتالاز مثبت بود. این امر نشان‌دهنده آن است که با افزایش فعالیت این آنزیم، مقاومت به خشکی (شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی) نیز بیشتر می‌شود. همانند کاتالاز، تأثیر گایاکول پراکسیداز بر مقاومت به خشکی، افزایشی بود. ولی با توجه به ضرایب استاندارد شده، این تأثیر کمتر از کاتالاز به دست آمد. به لحاظ منفی شدن ضریب رگرسیونی استاندارد برای آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز می‌توان گفت که با افزایش فعالیت این آنزیم، مقاومت ماش به تنش خشکی افزایش نمی‌یابد.

**نتیجه‌گیری:** غلظت بهینه آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز برای حصول حداکثر مقاومت به خشکی ماش به ترتیب برابر با  $0.956 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$ ،  $24/23 \text{ AU g}^{-1} \text{ FW}$  و  $21/23 \text{ AU g}^{-1} \text{ FW}$  بود. شایان ذکر است که این غلظت‌های بهینه، همه در دامنه غلظت‌های مشاهده شده بودند. به علاوه این که طبق گزارش‌ها، از لحاظ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ماش، تنوع ژنتیکی (پیش‌نیاز انجام امور اصلاحی در جهت غلظت‌های بهینه) وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** بهینه‌سازی، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز

## مقدمه

بهینه‌سازی، هنر یافتن بهترین جواب در بین وضعیت‌های موجود است. این رویه، در طراحی و نگهداری بسیاری از سیستم‌های مهندسی، اقتصادی و حتی اجتماعی به منظور حداقل کردن هزینه لازم و یا حداکثر کردن سود کاربرد دارد. به دلیل کاربرد وسیع بهینه‌سازی در علوم مختلف، این مبحث مورد توجه بسیاری از پژوهشگران واقع شده است. این رویه در ریاضیات، مدیریت و بسیاری از شاخه‌های علوم مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرد و حتی نام‌های متفاوتی از قبیل برنامه‌ریزی ریاضی و تحقیق در عملیات برای اشاره به مباحث بهینه‌سازی به کار می‌رود.

به طور کلی، برای استخراج مدل ریاضی یک مسأله بهینه‌سازی باید سه مؤلفه زیر مدنظر قرار گیرد:

۱- تعیین یک مجموعه از متغیرها  $(x_1, \dots, x_n)$  موسوم به به متغیرهای بهینه‌سازی یا متغیر تصمیم.

۲- مشخص نمودن یک تابع موسوم به تابع هدف یا تابع معیار که بر روی متغیرهای تصمیم اعمال می‌شود و یک مقدار حقیقی را برمی‌گرداند. سپس این تابع باید بهینه (مینیمم برای هزینه‌ها و نهاده‌ها، و یا ماکزیمم برای ستاده‌ها و محصول) گردد.

۳- اعمال مجموعه‌ای از قیدها بر روی متغیرهای تصمیم. این قیود می‌توانند به صورت تساوی یا غیرمساوی اعمال شوند. در اصل،  $xi$  از مجموعه  $Di$  انتخاب می‌گردد  $(xi \in Di)$ . قیود دامنه‌ای  $xi \in Di$  برای اعمال شرایط خاصی روی متغیرهای از قبیل قیود کرانه‌ای به صورت  $a \leq xi \leq b$  یا صحیح بودن متغیرها مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در شرایط تنش خشکی، ستنز رادیکال‌های آزاد و در نتیجه سیستم دفاعی (ستنز آنتی‌اکسیدان‌ها) دچار تغییر و تحول می‌شود. رادیکال‌های آزاد عمدتاً در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تولید

خشکی می‌باشد. خروجی این بهینه‌سازی می‌تواند مورد استفاده متخصصان اصلاح نباتات قرار گیرد. به بیان دیگر، اصلاح‌گران می‌توانند با دست‌کاری ژنتیکی گیاه در جهت فعالیت بهینه XS، مقاومت به خشکی را افزایش دهند. هدف از این آزمایش، انجام بهینه‌سازی مذکور در ماش بود. به‌منظور دقت آزمایش در اعمال تنش خشکی و از طرف دیگر افزایش تعمیم‌پذیری نتایج به شرایط مزرعه، از آزمایش گلدانی در هوای آزاد استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده، طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود که در سال ۱۳۹۴ به‌صورت گلدانی (در هوای آزاد) در شهرستان گنبد کاووس (طول جغرافیایی: ۵۵ درجه و ۱۸ دقیقه؛ عرض جغرافیایی: ۳۷ درجه و ۱۷ دقیقه) اجرا گردید. گنجایش گلدان‌ها (۲۰×۳۰ سانتی‌متر)، پنج کیلوگرم خاک بود که در هر کدام، پنج عدد بذر لاین VC1973a ماش ( *Vigna radiata* L. کشت شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها بافت سیلتی لوم داشت که نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم قابل دسترس آن به‌ترتیب ۱/۲ درصد، ۹/۵ و ۶۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، میزان pH ۸/۱ و هدایت الکتریکی آن ۰/۷۳ دسی‌زیمنس بر متر بود. بذر مورد استفاده، از اداره جهاد کشاورزی شهرستان گنبد کاووس تهیه گردید.

تنک کردن در مرحله چهار برگی انجام شد که طی آن، دو گیاه باقی ماند. پس از محاسبه ظرفیت زراعی (FC) خاک با استفاده از روش کلوت (۱۳)، چهار سطح کم آبیاری با سه تکرار شامل ۸۰ درصد (شاهد)، ۶۵ درصد، ۵۰ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی اعمال گردید. بر اساس روش کلوت (۱۳)، چهار نمونه ۱۰۰ گرمی خاک را از الک دو میلی‌متری گذرانده و در داخل سیلندرهای مخصوص ریخته شد

می‌شوند. به‌عنوان نمونه، در فرآیند تنفس نوری هنگامی که گلیکولات توسط آنزیم گلیکولات اکسیداز به گلی اکسیلیک اسید اکسید می‌گردد،  $H_2O_2$  در پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌شود (۱۶ و ۱۸). باید توجه داشت که رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های پایین (شرایط بدون تنش)، به‌عنوان مولکول سیگنال عمل نموده و در فرآیندهای بیان ژن و متابولیسم سلول، به‌طور مثبت مشارکت می‌کنند. این در حالی است که با افزایش غلظت آن‌ها، تأثیر مخربی بر سلول گذاشته می‌شود. زیرا در این شرایط، اکسید شدن پروتئین‌ها، رنگدانه‌های فتوسنتزی، اسیدهای چرب و اسیدهای نوکلئیک رخ داده و کلروز و نکروز شدن بافت گیاه بروز می‌نماید (۱ و ۲۳). این تأثیر دو سویه مثبت و منفی رادیکال‌های آزاد باعث شده است که توجه زیادی به آن‌ها معطوف گردد (۱۷).

آنتی‌اکسیدان‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی. آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن، آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول و گلووتاتیون احیا شده هستند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی را گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و گلووتاتیون ردوکتاز تشکیل می‌دهند (۱۵؛ ۲۵).

می‌توان گفت که تأثیر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز (متغیرهای مستقل یا تأثیرگذار؛ XS) در صفاتی مانند رشد و تولید دانه (به‌ترتیب عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت؛ متغیرهای وابسته یا تأثیرپذیر؛ Ys) منعکس می‌شود. با حداکثر نمودن تابع Ys نسبت به XS، می‌توان ترکیبی از XSها را به‌دست آورد که بالاترین مقدار ممکن Ys حاصل گردد. این عمل را بهینه‌سازی می‌نامند (۲۶) که اساس آن، روابط مبتنی بر تغییرات ایجاد شده در XS و Ys بر اثر تنش

به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت  $16000\text{g}$  و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (مدل دستگاه: TL220) شده و از محلول شفاف رویی برای سنجش غلظت آنزیم استفاده گردید (۲).

برای اندازه‌گیری غلظت آنزیم کاتالاز، ابتدا محلول حاوی بافر فسفات پتاسیم ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ )  $50$  میلی‌مولار با  $\text{pH}$  برابر با هفت و  $\text{H}_2\text{O}_2$   $20$  میلی‌مولار تهیه گردید. سپس  $50$  میکرولیتر از عصاره آنزیم به سه میلی‌لیتر از محلول فوق اضافه شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، در  $240$  نانومتر میزان جذب اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۰). با توجه به ضریب جذب مولی  $\text{H}_2\text{O}_2$  که برابر با  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$   $0.36$  است، غلظت آنزیم محاسبه گردید و به صورت میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2$  اکسید شده بر گرم وزن تر بر دقیقه بیان گردید. بر طبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2$  در مدت یک دقیقه در دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد می‌شود. برای شاهد، میزان کاهش جذب برای شرایط عدم وجود  $\text{H}_2\text{O}_2$  و پروتئین در محلول مدنظر قرار گرفته شد.

غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲۲). در این روش، پس از تهیه عصاره‌های آنزیمی به میزان  $50$  میکرولیتر، غلظت آنزیم با اندازه‌گیری میزان ممانعت از انجام واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم ( $\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{O}_6$ ) تعیین گردید. محلول واکنش برای سنجش غلظت آنزیم شامل  $13$  میلی‌مول متیونین ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ )،  $75$  میکرومول نیتروبلوترازولیوم کلراید ( $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_6$ )،  $100$  میکرومول EDTA و دو میکرومول ریبوفلاوین ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ ) به همراه  $50$  میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) با  $\text{pH}$   $7.5$  بود. نمونه‌ها (دارای

و ارتفاع خاک و قطر سیلندر به وسیله خط‌کش دقیقاً اندازه‌گیری شد. سپس سیلندرها را به صورت عمودی قرار داده و به آرامی به آن‌ها آب اضافه گردید تا جبهه رطوبتی به نصف طول سیلندر برسد. انتهای باز سیلندر را به وسیله پلاستیکی که چند سوراخ ریز در آن ایجاد شده بود پوشانیده و پس از  $48$ ،  $44$  و  $96$  ساعت از قسمت مرطوب هر سیلندر دو نمونه خاک برداشت شد. نمونه‌ها پس از توزین در آون با دمای  $110$  درجه سانتی‌گراد خشک نموده و متوسط رطوبت وزنی هر سیلندر محاسبه گردید. با استفاده از حجم محاسبه شده خاک در سیلندرها، متوسط چگالی ظاهری خاک را محاسبه و با استفاده از رطوبت وزنی و چگالی ظاهری محاسبه شده، رطوبت حجمی ظرفیت مزرعه به دست آورده شد. با فرض این‌که چگالی حقیقی خاک  $2/56$  گرم بر سانتی‌متر مکعب باشد، تخلخل تهویه‌ای خاک در ظرفیت مزرعه محاسبه گردید. سپس رطوبت ظرفیت مزرعه را بر حسب ارتفاع آب به سانتی‌متر برای خاک مذکور محاسبه شد.

به منظور اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در زمان گل‌دهی نسبت به برداشت نمونه مرکب از کل برگ‌های گیاه اقدام گردید. تهیه نمونه مرکب به این صورت بود که نمونه‌هایی از برگ‌های بالا، وسط و پایین گیاه جدا گردید و با هم مخلوط شد. یک گرم از برگ در نیتروژن مایع به خوبی همگن شد. سپس مقدار سه میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم  $100$  میلی‌مولار با  $\text{pH}$  برابر با  $7/8$  که حاوی EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  $0/1$  میلی‌مولار بود به آن اضافه و سائیده شد. جهت جلوگیری از افزایش دمای نمونه‌ها، تمام مراحل استخراج بر روی یخ انجام گرفت. عصاره حاصل

1- Ethylene Dinitrilo Tetra Acetic Acid Disodium Salt Dihydrate

$$d_i = 0, \quad \hat{Y} < B$$

که در آن A و B به ترتیب حداقل و حداکثر مقدار به دست آمده برای مشاهده  $\hat{A}_m$  و  $w_i$  وزن می باشد. برای محاسبه تابع مطلوبیت کلی (D)، از رابطه زیر استفاده شد (۸):

$$D = (d_1^{p1} \times d_2^{p2} \times d_3^{p3} \times \dots \times d_n^{pn})^{1/n} \quad (2)$$

که  $d_1 \dots d_n$  متغیرهای پاسخ،  $p1 \dots pn$  توان (اهمیت نسبی) متغیرهای پاسخ بوده و می تواند مقادیر از یک تا پنج را به خود اختصاص دهند.

در بررسی اولیه، مدل های خطی و غیرخطی مختلف رگرسیون چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی اولیه نشان داد که تابع زیر مناسب تر می باشد:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3)$$

که Y متغیر پاسخ شامل تابع مربوط به شاخص برداشت، عملکرد بیولوژیکی و تابع مطلوبیت کلی است.  $X_1$ ،  $X_2$  و  $X_3$  به ترتیب آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز می باشند.  $\beta$  پارامتر تابع است که باید مقدار آن برآورد گردد. از روش حذف برگشتی برای خارج کردن اجزای غیر معنی دار مدل استفاده شد (۲۱). به لحاظ عدم وجود همبستگی مثبت قوی (همبستگی بزرگتر یا برابر با +۰/۹۵) بین عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت در این بررسی ( $r=0.46$ )، از روش مبتنی بر الگوریتم ژنتیک برای یافتن مقادیر بهینه سه آنزیم آنتی اکسیدان استفاده شد. برای محاسبات، نرم افزار متلب (نسخه ۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه همبستگی این آزمایش نشان داد که بین عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت ماش {دو عامل که برهم کنش (حاصل ضرب) آن ها تعیین کننده

عصاره آنزیمی) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد زیر لامپ فلوروسنت (۳۰ وات) با فاصله ۲۰ سانتی متر قرار داده شدند. پس از پنج دقیقه، نمونه ها به تاریکی منتقل گردیدند و با دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نمونه ها در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. در اصل، اختلاف جذب نمونه های دارای عصاره آنزیمی و شاهد (نمونه های فاقد عصاره آنزیمی) نشان دهنده ممانعت واکنش تشکیل ماده رنگی فورماران (4-2-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride) توسط آنزیم می باشد. طبق تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مقدار فعالیت آنزیمی است که باعث ۵۰ درصد ممانعت از احیای نیتروبولوتترازولوم به فرمازان می شود.

برای اندازه گیری غلظت آنزیم گایاکول پراکسیداز، ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم استخراج شده از برگ مورد استفاده قرار گرفت و به محلولی شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم با pH ۶/۸، ۲۰ میلی مول گایاکول ( $C_7H_8O_2$ ) و ۲۰ میلی مول  $H_2O_2$  اضافه گردید. بعد از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، با افزودن ۰/۵ میلی لیتر  $H_2SO_4$  ۵ درصد (v/v) واکنش متوقف شد و جذب در ۴۸۰ نانومتر قرائت گردید (۲). یک واحد گایاکول پراکسیداز به صورت تغییر یک واحد جذب در یک میلی لیتر آنزیم استخراج شده تعیین گردید.

تعیین غلظت بهینه سه آنزیم آنتی اکسیدان: سه آنزیم آنتی اکسیدان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز به عنوان متغیر مستقل (Xs) و عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت (Ys) به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ در نظر گرفته شدند. برای محاسبه تابع مطلوبیت جزئی ( $d_i$ )، از رابطه زیر استفاده گردید (۳):

$$d_i = \left( \frac{\hat{Y}-A}{B-A} \right)^{w_i}, \quad A \leq \hat{Y} \leq B$$

$$d_i = 1, \quad \hat{Y} > B \quad (1)$$

روش تابع اتلاف (۱۹؛ ۲۴) از ارجحیت بالاتری برخوردار می‌باشد. علت این امر، جامعیت و انعطاف‌پذیری تابع در اهمیت (وزن) دهی (به معادله ۲ مراجعه شود) به متغیرها است (۲۶). به لحاظ حصول ضرایب تبیین بالا ( $R^2$  و Adjusted  $R^2$ ) (جدول ۱)، روش مذکور توانست به خوبی واکنش متغیرهای پاسخ را به سه آنزیم آنتی‌اکسیدان پیش‌بینی نماید به‌ویژه این‌که با استفاده از روش حذف بک وارد، پارامترهای غیر معنی‌دار از تابع حذف گردیدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که به‌طور مورد انتظار، اثر تنش خشکی بر کلیه صفات معنی‌دار بود (نتایج ارایه نشده) و تنوع زیادی در صفات ایجاد نمود (جدول ۲)؛ به‌عنوان نمونه، دامنه تغییرات غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر بیش از ۱۰۰ درصد مقدار حداقل آن بالغ گردید.

عملکرد دانه است { رابطه مثبت قوی (ضریب همبستگی بزرگ‌تر از  $+0/95$ ) وجود نداشت ( $r=0.46$ ) و از واکنش متفاوتی نسبت به سه آنزیم برخوردار بودند. به بیان دیگر، بهترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای حصول بالاترین عملکرد بیولوژیکی مشابه بهترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای حصول بالاترین شاخص برداشت نبود. در این شرایط، بهینه‌سازی با پیچیدگی مواجه می‌شود. چون نقاط بهینه موضعی تابع افزایش نشان می‌دهد. برای فایق آمدن بر این پیچیدگی و اجتناب از نقاط بهینه موضعی، از رویه بهینه‌سازی مبتنی بر الگوریتم ژنتیک استفاده شد (۹).

در این بررسی برای کمی کردن واکنش عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت، از روش تابع مطلوبیت استفاده گردید. این روش نسبت به روش‌های دیگر از جمله روش تابع فاصله (۱۲) و

جدول ۱- اجزای مدل و پارامترهای آن بعد از حذف به روش بک‌وارد برای پیش‌بینی تغییرات شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی ماش در شرایط تنش خشکی.

Table 1. Model components and its parameters after backward elimination for predicting the changes in biological yield and harvest index of drought-stressed Mung Bean.

اجزای مدل Model components	شاخص برداشت Harvest index		عملکرد بیولوژیکی Biological yield	
	پارامترهای استاندارد نشده Non-standardized parameters	پارامترهای استاندارد شده Standardized parameters	پارامترهای استاندارد نشده Non-standardized parameters	پارامترهای استاندارد شده Standardized parameters
	عرض از مبدأ Intercept	-3.873	0	-16.662
$X_1$	0.089	21.849	0.555	13.523
$X_2$	-1.800	-10.396	-3.441	-1.987
$X_3$	0.202	15.427	1.034	7.874
$X_{12}$	0.075	3.204	-0.055	-0.234
$X_{13}$	-0.005	-14.954	-0.028	-8.153
$X_{23}$	---	---	--	---
$R^2$	0.988	---	0.997	---
$R^2$ تعدیل شده	0.978	---	0.990	---
Adjusted $R^2$				

جدول ۲- برخی از ویژگی‌های آماری صفات مورد مطالعه ماش.

Table 2. Some statistical properties of Mung Bean studied traits.

آماره Statistic	غلظت کاتالاز Catalase concentration ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}\text{FW}$ )	غلظت سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase concentration ( $\text{AU g}^{-1}\text{FW}$ )	غلظت گایاکول پراکسیداز Guaiacol proxidase concentration (AU $\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	عملکرد بیولوژیکی (گرم در بوته) Biological yield ( $\text{g.plant}^{-1}$ )	شاخص برداشت Harvest index
حداقل Minimum	0.368	22	16	5.034	0.080
حداکثر Maximum	1.000	48	25	8.103	0.206
دامنه Range	0.632	26	9	3.069	0.126
متوسط Average	0.641	35	21	7.008	0.144

بررسی‌های انجام شده بر روی ماش در شرایط شاهد، ۱۰۰ میلی‌مول NaCl، ۱۰۰ میلی‌مول NaCl + پنج میلی‌مول  $\text{CaCl}_2$ ، و پنج میلی‌مول  $\text{CaCl}_2$  مشخص شد که در تمام تیمارها در مقایسه با شاهد، غلظت آنزیم کاتالاز افزایش نشان می‌دهد (۱۴). در گندم، اختلاف معنی‌داری بین ارقام از لحاظ میزان فعالیت این آنزیم به دست نیامده است (۱۷). در گیاهان دیگر، برخی از گزارش‌ها بر عدم تغییر فعالیت کاتالاز در شدت‌های مختلف کم آبیاری دلالت دارد (۲۷).

سوپراکسید دیسموتاز اولین عامل دفاع آنزیمی گیاه در مقابل رادیکال‌های آزاد به‌شمار می‌آید که تبدیل  $\text{H}_2\text{O}_2$  به آب و  $\text{O}_2$  را کاتالیز می‌نماید (۶). سوپراکسید دیسموتاز پروتئینی است که سایت فعال آن ممکن است مس و روی (هر دو)، منگنز یا آهن و نیکل را مورد استفاده قرار دهد. بر همین اساس، این آنزیم دارای سه فرم  $\text{Cu/Zn}$ ،  $\text{Fe-Mn}$  و  $\text{Ni}$  است. به لحاظ منفی شدن ضریب رگرسیون استاندارد برای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (جدول ۱) می‌توان گفت که با افزایش فعالیت این آنزیم، مقاومت ماش به تنش خشکی افزایش نمی‌یابد. مقدار بهینه غلظت این آنزیم برابر با  $24/23 \text{ AU g}^{-1} \text{ FW}$  شد. با در نظر گرفتن

کاتالاز یک تترامر زنجیره چهارتایی پلی‌پپتید است که هر زنجیره آن بیش از ۵۰۰ اسید آمینه را شامل می‌گردد. pH مطلوب برای فعالیت آن بسته به گونه گیاهی بین چهار تا ۱۱ می‌باشد. دمای مطلوب آن نیز بسته به گونه گیاهی فرق می‌کند (۲۵). کاتالاز از آنزیم‌های مهم برای حذف  $\text{H}_2\text{O}_2$  موجود در پراکسی‌زوم‌ها به‌شمار می‌رود (۱۱). مقدار بهینه غلظت کاتالاز که توسط الگوریتم ژنتیک به دست آمد برابر با  $0/956 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  بود. ضریب رگرسیونی استاندارد به دست آمده برای این آنزیم مثبت بود (جدول ۱). این امر نشان‌دهنده آن است که با افزایش فعالیت این آنزیم، مقاومت به خشکی (شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی) نیز بیشتر می‌شود. بر همین اساس به نظر می‌رسد که در تنش خشکی، غلظت  $\text{H}_2\text{O}_2$  افزایش قابل توجهی می‌یابد. شایان توجه است که وجود  $\text{H}_2\text{O}_2$  در گیاه از این نظر حایز اهمیت می‌باشد که در غلظت‌های متوسط، به عنوان مولکول سیگنال عمل نموده و در سنتز پیش‌ماده‌های پروتئین دیواره سلولی مشارکت دارد. ولی در غلظت‌های بالا برای گیاه سمی بوده و آسیب‌های اکسیداتیو را به دنبال دارد (۱۷). در

آید. زیرا  $O_2^-$ ، کوئینون‌ها و کمپلکس‌های دارای  $Fe^{3+}$  و  $Cu^{2+}$  را احیا می‌نماید. از این رو فعالیت آنزیم‌های واجد فلز را به‌طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد.

گایاکول پراکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم گروه پراکسیدازها است که گایاکول (متوکسی فنل؛ یکی از معمول‌ترین سوبستراهای این آنزیم) را اکسید می‌نماید و بالاترین فعالیت را در حدود دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد (۴). این آنزیم علاوه بر عمل جمع‌آوری  $H_2O_2$ ، در بیوستز اجزای دیواره سلولی و لیگنینی شدن آن مشارکت دارد (۲). در این بررسی، بهترین غلظت این آنزیم برای حصول بالاترین مقاومت به خشکی ماش برابر با  $1 AU g^{-1}$  FW ۲۱/۲۳ به‌دست آمد. همانند کاتالاز، تأثیر گایاکول پراکسیداز بر مقاومت به خشکی، افزایشی بود (جدول ۱). ولی با توجه به ضرایب استاندارد شده (جدول ۱) این تأثیر کمتر از کاتالاز به‌دست آمد.

این موضوع که سوپراکسید دیسموتاز عمل جمع‌آوری  $O_2^-$  را انجام می‌دهد، به‌نظر می‌رسد عدم مشارکت آن در مقاومت به خشکی مربوط به علت عدم افزایش قابل توجه  $O_2^-$  در ماش تنش دیده باشد. این نتیجه‌گیری با توجه به دو اصل زیر قابل تحلیل است (الف)  $O_2^-$  از لحاظ واکنش‌پذیری، در حد متوسط بوده و نیمه عمر بسیار کوتاهی دارد. بر همین اساس قادر به عبور از غشاهای بیولوژیکی نبوده و در ماش سریعاً به  $H_2O_2$  تغییر می‌نماید (۷). (ب) آنزیم کاتالاز مسئول حذف  $H_2O_2$  بوده (۱۱) و برعکس سوپراکسید دیسموتاز، افزایش فعالیت آن باعث مقاومت به خشکی می‌گردد. به بیان دیگر، در ماش روییده در شرایط تنش خشکی، ممکن است  $O_2^-$  به جای این‌که توسط سوپراکسید دیسموتاز حذف گردد، سریعاً به  $H_2O_2$  تبدیل شده و  $H_2O_2$  توسط آنزیم کاتالاز جمع‌آوری می‌گردد. در صورت تأیید این تحلیل توسط پژوهش‌های بعدی، تبدیل سریع  $O_2^-$  به  $H_2O_2$  در ماش می‌تواند یک مزیت برای این گیاه به‌شمار

جدول ۳- اجزای مدل و پارامترهای غیر استاندارد شده آن بعد از حذف به روش بک‌وارد برای تعیین مطلوبیت کل برای سه حالت: (الف) اهمیت یکسان شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی (توان ۱ در معادله ۲ برای هر متغیر) در تحت تأثیر قرار دادن عملکرد دانه، (ب) اهمیت بالای شاخص برداشت (توان ۵) و اهمیت پایین عملکرد بیولوژیکی (توان ۱)، و (ج) اهمیت بالای عملکرد بیولوژیکی (توان ۵) و اهمیت پایین شاخص برداشت (توان ۱).

Table 3. Model components and its non-standardized parameters after backward elimination for general desirability for 3 scenarios: (A) The same importance for both HI and biological yield (power of 1 in equation 2 for both variables), (B) High importance (power of 5) for HI, but low importance (power of 1) for biological yield, and (C) High importance (power of 5) for biological yield, but low importance (power of 1) for HI.

اجزای مدل Model components	مطلوبیت کل General desirability		
	اهمیت یکسان	اهمیت بالای شاخص برداشت	اهمیت بالای عملکرد بیولوژیکی
	Same importance	High importance for HI	High importance for biological yield
عرض از مبدأ Intercept	-21.061	-27.302	-16.499
$X_1$	0.571	0.657	0.503
$X_2$	-7.274	-11.519	-4.187
$X_3$	1.177	1.441	0.972
$X_{12}$	0.186	0.435	0.016
$X_{13}$	-0.031	-0.038	-0.026
$X_{23}$	--	--	--
$R^2$	0.995	0.984	0.993
تعدیل شده $R^2$	0.991	0.972	0.990
Adjusted $R^2$			

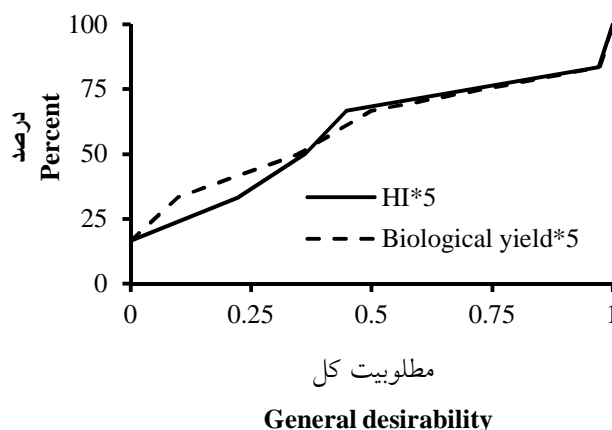


پراکسیداز برای حصول حداکثر مقاومت به خشکی ماش به ترتیب برابر با  $0.956 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$  و  $21/23 \text{ AU g}^{-1} \text{ FW}$  بود. تعیین این غلظت‌ها بر این اصل استوار بود که تأثیرپذیری عملکرد بیولوژیکی از تنش خشکی تقریباً مشابه شاخص برداشت هست (نتایج ارایه نشده) و اهمیت هر دو متغیر در تعیین عملکرد دانه یکسان در نظر گرفته شد (در معادله ۲، به هر دو متغیر توان یک اختصاص داده شد). در صورتی که در تنش‌های دیگر از جمله تنش شوری، تأثیرپذیری عملکرد بیولوژیکی مشابه شاخص برداشت نباشد، با اختصاص توان مناسب به هر متغیر در معادله ۲ می‌توان غلظت‌های ایده‌آل مربوطه را به دست آورد. در اصل با تغییر توان (اهمیت)، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در پارامترها (جدول ۳) و مقادیر مطلوبیت کل (شکل ۱)، رخ می‌دهد.

در خصوص نتایج این بررسی، دو نکته قابل تأمل وجود دارد. (الف) غلظت‌های بهینه به دست آمده در این مطالعه، همه در دامنه غلظت‌های مشاهده شده در آزمایش گلدانی در هوای آزاد بودند (جدول ۲). (ب) خوشبختانه از لحاظ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ماش تنوع ژنتیکی وجود دارد (۱۶)؛ چون پیش‌زمینه ضروری برای انجام به‌نژادی در جهت دستیابی به غلظت‌های بهینه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، وجود تنوع ژنتیکی است. با توجه به این دو موضوع می‌توان گفت که افزایش مقاومت به خشکی در ماش از طریق دستیابی به این غلظت‌های بهینه آنتی‌اکسیدان‌ها از طریق به‌نژادی امکان‌پذیر می‌باشد. در گیاهان دیگر از جمله چغندر قند (۵) و توتون نیز از روش بهینه‌سازی استفاده شده است (۲۰).

### نتیجه‌گیری کلی

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که غلظت بهینه آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول



شکل ۱- توزیع فراوانی مقادیر مطلوبیت کل برای دو سناریوی اهمیت بالای شاخص برداشت (توان ۵ در معادله ۲) و اهمیت پایین عملکرد بیولوژیکی (توان ۱) (خط منقطع)، و اهمیت بالای عملکرد بیولوژیکی (توان ۵) و اهمیت پایین شاخص برداشت (توان ۱) (خط منقطع).

Figure 1. Frequency distribution of general desirability for 2 scenarios of high importance (power of 5 in equation 2) for HI, but low importance (power of 1) for biological yield (continuous line), and high importance (power of 5) for biological yield, but low importance (power of 1) for HI (dash line).

## منابع

1. Arora, A., Sairam, R.K., and Srivastava, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.*, 82: 1227–38.
2. Cavalcanti, F.R., Oliveira, J.T.A., Martins-Miranda, A.S., Viégas, R.A., and Silveira, J.A.G. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytol.*, 163: 563– 571.
3. Derringer, G., and Suich, R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.*, 12: 214-219.
4. Ghamsari, L., Keyhani, E., and Golkhoo, S. 2007. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iran. Biomedical J.* 11: 137-146. (In Persian)
5. Gholipoor, M., Emamgholizadeh, S., Hassanpour, H., Shahsavani, D., Shahoseini, H., Baghi, M., and Karimi, A. 2012. The optimization of root nutrient content for increased sugar beet productivity using an artificial neural network. *Int. J. Plant Prod.*, 6: 429-442.
6. Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biol.*, 32: 481–494.
7. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
8. Harrington, E.J.R. 1965. The desirability function. *Industrial Qual. Control.*, 21: 494-498.
9. Haupt, R., and Haupt, S.E. 1998. *Practical Genetic Algorithms*. John Wiley and Sons.
10. Havar, E.A., and McHale, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 84: 450–455.
11. Hirt, H., and Shinozaki, K. 2004. *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer, Vienna, Austria.
12. Khuri, A.I., and Conlon, M. 1981. Simultaneous optimization of multiple responses represented by polynomial regression functions. *Technometrics.*, 25: 199-204.
13. Klute, A. 1986. Water Retention: Laboratory Methods. In: C.A. BLACK (Ed.). *Methods of Soil Analysis. I. Physical and Mineralogical Methods*. Madison: ASA, SSSA., Pp: 635-662.
14. Manivannan, P., Abdul-Jaleel, C., Kishorekumar, A., Sankar, B., Somasundaram, R., Sridharan, R., and Panneerselvam, R. 2007. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* L. Walp. by propiconazole under water deficit stress. *Colloids and Surfaces Biointerfaces.*, 57: 69–74.
15. Mohammadi, S., Heidari, M., Dahmarde, M., and Asgharipour, M.R. 2016. Effect of nitrogen and arsenic on photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activities and nutrient content in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Electronic J. Crop Prod.*, 8: 105-120. (In Persian)
16. Nassourou, M.A., Njintang, Y.N., Noubissié, T.J., Nguimbou, R.M., and Bell, J.M. 2016. Genetics of seed flavonoid content and antioxidant activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Crop J.*, 27: 105-116.
17. Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S.D., Driscoll, S., Novitskaya, L., and Foyer, C.H. 2002. Drought and oxidative load in wheat leaves. A predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.*, 89: 841–850.
18. Peltzer, D., Dreyer, E., and Polle, A. 2002. Temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 141–50.
19. Pignatiello, J.J. 1993. Strategies for robust multi-response quality engineering. *IIE Trans.*, 25: 5-15.
20. Salehzadeh, H., Gholipoor, M., Abbasdokht, H., and Baradaran, M. 2016. Optimizing plant traits to increase yield quality and quantity in tobacco using artificial neural network. *Int. J. Plant Prod.*, 10: 97-108.

21. Sivakumar, T., Manavalan, R., and Valliappan, K. 2007. Global optimization using derringer's desirability function: Enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices. *Acta Chromatographica.*, 19: 29-47.
22. Van Rossun, M.W.P.C., Alberda, M., and Van Der Plas, L.H.W. 1997. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Sci.*, 130: 207–216.
23. Villalobos, M.A., Bartels, D., and Iturriaga, G. 2004. Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* over expressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiol.*, 135: 309-324.
24. Vinning, G.G. 1998. A compromise approach to multi-response optimization. *J. Qual. Technol.*, 30: 309-313.
25. Xu, P.L., Guo, Y.K., Bai, J.G., Shang, L., and Wang, X.J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum.*, 132: 467–478.
26. Zadbood, A., Noghondarian, K., and Zadbood, Z. 2013. Multiresponse surface optimization via harmony search algorithm. *Int. J. Industrial Engineering and Prod. Res.*, 24: 131-136.
27. Zhang, J., and Kirkham, M.B. 1994. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, 35: 785-791.

