علوم و تحقیقات بذر ایران
سال پنجم/ شماره سوم/ ۱۳۹۷ (۱۷ - ۱)

DOI: 10.22124/jms.2018.2931

تأثیر نانواکسید روی و تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تحرک ذخایر غذایی بذر سویا (*Glycine max*. L) رقم کتول (DPX)

محمد صدقی[۱*]، سحر طلوعی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۹

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر نانواکسید روی و خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلایکول بر میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تحرک ذخایر غذایی بذر سویا آزمایشی در سال ۱۳۹۵ در دانشگاه محقق اردبیلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح تنش خشکی (صفر، ۰/۷- و ۱/۴- مگاپاسکال) و غلظت‌های مختلف نانواکسید روی (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم در لیتر) بود. درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن خشک گیاهچه، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک (آلفاآمیلاز، پروتئاز و لیپاز) و روند تحرک ذخایر بذر (کربوهیدرات، پروتئین و لیپید) اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش نشان‌دهنده تأثیر مثبت نانواکسید روی بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تحرک ذخایر کربوهیدرات، پروتئین و لیپید بود، به‌طوری‌که کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانواکسید روی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز و آلفاآمیلاز به ترتیب به میزان ۱۱/۷۵، ۱۲/۷۵ و ۱۱/۸۷ درصد در خشکی شدید نسبت به شاهد بدون تنش گردید. تنش خشکی نیز علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک، از میزان تحرک ذخایر غذایی کاست. همچنین با گذشت زمان آبنوشی از میزان تحرک کربوهیدرات‌ها، پروتئین و لیپیدها بر اثر تنش خشکی کاسته شد، در حالی که کاربرد نانواکسید روی میزان تحرک ذخایر بذر را که بیانگر مصرف آن‌ها در رشد و تولید وزن خشک بیشتر گیاهچه است، افزایش داد. با توجه به تاثیر مثبت نانواکسید روی بر کاهش آسیب‌های ناشی از تنش خشکی و همچنین افزایش کارایی مصرف ذخایر غذایی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و درصد جوانه‌زنی به نظر می‌رسد که کاربرد نانواکسید روی به میزان ۱/۵ گرم در لیتر موجب بهبود جوانه‌زنی سویا تحت شرایط خشکی خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، پروتئاز، تحرک ذخایر غذایی، لیپاز

۱- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- استادیار، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
* نویسنده مسئول: m_sedghi@uma.ac.ir

مقدمه

سویا (*Glycine max* L.) گیاهی دولپه‌ای، خودگشن، روز کوتاه و یک‌ساله از تیره فاباسه و یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی است که موارد استفاده زیادی در کشاورزی و صنعت دارد (Alyari *et al*., 2000). سویا جزو گیاهانی است که از طریق بذر تکثیر می‌یابد و قادر است که در اکثر شرایط آب و هوایی رشد کند (Klee and Estelle, 1991)، ولی خشکی و کمبود آب، رشد آن را محدود می‌کند (Ober and Sharp, 2003).

کم‌آبی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی مؤثر بر بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، تنفس، متابولیسم‌های مربوط به جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها است (Turkan., 2011). از اثرات مضر تنش خشکی بر جوانه‌زنی می‌توان به کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی (Bradford and Nonogaki, 2007; Turk *et al*., 2004)، کاهش فعالیت آلفاآمیلاز (Cui *et al*., 2004) و کاهش تحرک ذخایر غذایی (Bradford and Nonogaki, 2007) اشاره کرد. همچنین کمبود آب می‌تواند منجر به به ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید انواع اکسیژن فعال[1] (ROS) در گیاهان شود. انواع اکسیژن فعال طی فرایندهای زیستی سلول به وجود می‌آیند (Mittler, 2002) و به ساختارهای سلولی از جمله غشاهای لیپیدی، پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها آسیب می‌رسانند (Farooq *et al*., 2009). خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو بر پروتئین‌های بذر در هنگام جوانه‌زنی شناخته شده است (Job *et al*., 2005)، به‌طوری‌که گزارش‌ها نشان می‌دهد که ROS منجر به آسیب‌های شدید به پروتئین‌ها، حتی در گونه‌های وحشی می‌شود. همچنین بیشتر آسیب‌ها در فرایند بتااکسیداسیون چربی‌ها به وسیله ROS و به طور فزاینده‌ای توسط NADPH اکسیداز انجام می‌شود (Kwak *et al*., 2003).

از عوامل مختلفی که می‌توانند خسارت ناشی از تنش خشکی را کاهش دهند، می‌توان به عنصر روی اشاره کرد، زیرا می‌تواند حساسیت گیاهان به تنش خشکی را کاهش دهد (Bagci *et al*, 2007). روی یکی از اجزای اصلی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (CuZn-SOD) (Hajiboland, 2012)، هورمون اکسین و پیش‌ماده آن (تریپتوفان) است (Bennett and Skoog, 2002; Waraich *et al*, 2011). افزایش سطح اکسین بر اثر کاربرد روی موجب رشد ریشه می‌شود و تحمل گیاه به خشکی را افزایش می‌دهد. همچنین کاربرد روی فعالیت NADPH اکسیداز متصل به غشا را کاهش می‌دهد و موجب مهار تولید ROS می‌شود (Waraich *et al*, 2011). NADPHاکسیداز متصل به غشا، آنزیمی آپوپلاستی است که در تولید ROS نقش مهمی ایفا می‌کند (Pucciariello *et al*., 2012).

کمبود روی یکی از شایع‌ترین اختلالات غذایی در بسیاری از گیاهان است (Srinivasara *et al*., 2008). به گزارش گراهام و همکاران (Graham *et al*., 1992) و چاکماک و همکاران (Cakmak *et al*., 1999) کمبود عناصر ریزمغذی عامل محدودیت رشد بسیاری از گیاهان روغنی است و در این میان کمبود روی برای سویا در شرایط تنش اسمزی اهمیت زیادی دارد (Gupta and Gupta, 1984). در زمان جوانه‌زنی برای تامین انرژی و مواد غذایی در جنین باید مواد ذخیره‌ای از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و قندها تجزیه گردند که این عمل توسط آنزیم‌های هیدرولیتیک انجام می‌شود (Pessarakli, 2011). آلفاآمیلاز یکی از مهمترین آنزیم‌های هیدرولیتیک مربوط به جوانه‌زنی است و توسط جیبرلین فعال می‌شود. این آنزیم قادر است تا نشاسته را به قندهای ساده تبدیل کند (Pessarakli, 2011; Kim *et al*., 2005; Mousavi Nik *et al*., 2011). از آنجایی که دوره جوانه‌زنی در استقرار و رشد اولیه سریع گیاهچه‌ها اهمیت زیادی دارد، در این پژوهش تأثیر نانواکسید روی بر جوانه‌زنی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و میزان تحرک ذخایر غذایی سویا در شرایط خشکی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی تاثیر نانواکسید روی و تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلایکول بر میزان تحرک ذخایر غذایی و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح تنش خشکی (صفر، ۰/۷- و ۱/۴-

[1] Reactive Oxygen Species

مگاپاسکال) و غلظت‌های مختلف نانواکسید روی (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم بر لیتر) در سه تکرار بود. بذر سویای مورد استفاده در این آزمایش، بذر گواهی شده رقم کتول (DPX) تولید سال ۱۳۹۴بود که از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان) تهیه شد.

ابتدا بذرهای سویا با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی شد و پس از شست و شو با آب مقطر، به روی کاغذ صافی منتقل گردید. سپس، برای اعمال تیمار خشکی در غلظت‌های ۰/۷- و۱/۴- مگاپاسکال از محلول پلی اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ (به ترتیب به میزان ۵۷/۵ و ۹۰ گرم در لیتر بر اساس روش Michel and Kaufmann, 1973) استفاده شد. محلول نانواکسید روی (خلوص ۹۷ درصد، قطر ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر، سطح ویژه بیش از ۱۰ متر مربع بر گرم، ساخت شرکت سیگما آلدریچ، آلمان) نیز در غلظت‌های مذکور تهیه و به میزان ۵ میلی‌لیتر به هر تیمار اضافه شد. همچنین در تیمار شاهد فقط آب مقطر به کار برده شد. آب تبخیر شده در طول مدت آزمون با آب مقطر جایگزین گردید. دوره رشد ۸ روز، دمای محیط ۲۵ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت به صورت BP (بین دو کاغذ صافی) بود و شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده بر اساس خروج جوانه دو میلی‌متری به‌صورت روزانه و به طور مرتب تا روز هشتم ادامه پیدا کرد.

برای محاسبه درصد جوانه‌زنی از معادله (۱) استفاده شد:

$$Gp = 100 \times \langle \frac{N_G}{N_T} \rangle$$ رابطه (۱)

G_P درصد جوانه‌زنی، N_G تعداد بذرهای جوانه زده و N_T تعداد کل بذرها است.

برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی با شروع جوانه‌زنی بذرها، هر روز جوانه‌های تولید شده تا روز هشتم شمارش شدند. سرعت جوانه‌زنی بر اساس معادله (۲) (Ellis and Roberts, 1981) محاسبه گردید.

$$GR = \sum_{i=1}^{n} \frac{Si}{Di}$$ رابطه (۲)

در این رابطه GR = سرعت جوانه‌زنی (تعداد بذور جوانه-زده در هر روز)، Si= بذور جوانه‌زده در هر روز، Di= تعداد روز تا شمارش n ام و N= تعداد دفعات شمارش است.

برای تعیین وزن خشک گیاهچه، آزمون به مدت ۱۵ روز ادامه یافت و پس از این مدت از هر تیمار ۱۰ گیاهچه عادی به تصادف انتخاب و طول و وزن خشک گیاهچه اندازه‌گیری شد.

پنج روز پس از جوانه‌زنی و مطابق روش دومان و همکاران (Doman *et al*., 1982) میزان فعالیت آلفا آمیلاز سنجش شد. ابتدا بذرها در بافر فسفات ۶۰ میلی مولار (pH ۶/۸) هموژنیزه شد. سپس با سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه فیلتر گردید. فعالیت آنزیم در محلول واکنش که حاوی ۶۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH ۶/۸)، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلسیم کلراید و۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشاسته بود، مشخص شد. عصاره آنزیم (۱میلی لیتر) پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در حمام آب گرم به محیط آزمایش اضافه گردید. فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز با استفاده از نشاسته و با طول موج ۶۲۰ نانومتر بصورت میکروگرم نشاسته و گرم بر دقیقه مواد تازه مشخص گردید.

فعالیت آنزیم پروتئاز نیز به روش هولوردا و راجرز (Holwerda and Rogers, 1992) اندازه گیری شد. این آنزیم که از نوع اندوپروتئاز است، بر مبنای واکنش با آزوکازئین اندازه‌گیری و میزان جذب روشناور در طول موج ۳۶۶ نانومتر ثبت شد. به این منظور، عصاره پروتئینی استخراج شده با بریج، استات سدیم و آزوکازئین مخلوط و پس از ۵ ساعت به منظور توقف واکنش TCA به محیط اضافه شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور، از روشناور حاصل میزان جذب ثبت گردید.

برای سنجش آنزیم لیپاز نمونه‌ها سه بار با آب مقطر شستشو و با هاون در ۲۵ mL محیط آسیاب، خرد شدند. محیط آسیاب شامل ۰/۶ مول ساکارز، ۱ میلی مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۱ میلی مولار $MgCl_2$، ۲ میلی‌مولار DTT، ۰/۱۵ مولار بافر تری‌سین با pH ۷/۵ بود. هموژن حاصل پس از عبور دادن از کاغذ صافی در ۱۳۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتریفیوژ شد. روشناور حاصل بار دیگر در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتریفیوژ گردید و

روشناور حاصل از آن جهت تعیین فعالیت لیپاز مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز به روش رنگ سنجی انجام شد. مقدار ml ۱۰۰ از عصاره آنزیم با ml۱۰۰ تری لینولئین mM ۵۰ در بافر صمغ اقاقیای ۵٪ مخلوط شد. سپس، بافر سنجش شامل mM ۱۰۰ سوکسینات – هیدروکسید سدیم با pH ۴/۷ و ۵ mM DTT به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه قرار داده شد. واکنش با حرارت ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه متوقف شد. سپس، به روش فلورومتری (Huang, 1985) میزان فعالیت لیپاز تعیین گردید.

برای تعیین مقدار ذخایر غذایی بذر (کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها) از بذرهای در حال جوانه‌زنی در فواصل زمانی هر ۱۲ ساعت یک بار نمونه‌برداری انجام گردید.

به‌منظور تعیین مقدار کربوهیدرات‌های محلول در هر نمونه‌برداری، نیم گرم از نمونه با ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ در هاون چینی کوبیده شد. این عمل دو بار دیگر با ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ تکرار شد. محلول حاصل در ۳۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و روشناور جهت تعیین کربوهیدرات‌های محلول مورد استفاده قرار گرفت.

پس از استخراج، ۰/۱ میلی لیتر عصاره الکلی با ۳ میلی لیتر آنترون (۱۵۰ میلی گرم آنترون در ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد تا واکنش آغاز شود. تغییر رنگ محلول توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد (Irigoyen et al. 1992).

برای تعیین میزان لیپید موجود در نمونه‌ها، ابتدا ۱ گرم نمونه آسیاب شده و همگن از دانه درون لوله‌های آزمایشی که پیشتر وزن شده بودند، ریخته شد. سپس، جهت استخراج لیپیدها مقدار ۵ میلی لیتر دی‌اتیل‌اتر طی ۳ مرحله به لوله‌های آزمایش حاوی نمونه اضافه شد. لوله-های آزمایش حاوی نمونه در دستگاه اولتراسونیک مدل Eurosonic 4D با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفتند. سپس، لوله‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از ته نشین شدن، قسمت بالایی محلول توسط پیپت برداشته شد و در لوله آزمایش دیگری با وزن معلوم ریخته شد. مراحل استخراج فوق دو بار دیگر تکرار گردید. سپس، محلول استخراج شده حاصل، توسط گاز نیتروژن زیر هود خشکانده شد و دوباره وزن آن یادداشت گردید. اختلاف وزن لوله آزمایش حاوی نمونه و لوله آزمایش خالی به عنوان مقدار لیپید استخراج شده ازیک گرم بر حسب میلی گرم بر گرم نمونه ثبت و به صورت درصد لیپید گزارش شد.

برای تعیین میزان نیتروژن و پروتئین کل بذر از روش کجلدال استفاده شد. ابتدا ۰/۲ گرم از نمونه‌ی گیاهی پودر شده به همراه ۶ گرم کاتالیزور نیتروژن (که هر ۱۰۰ گرم آن حاوی ۹۶ گرم سولفات پتاسیم، ۳/۵ گرم سولفات مس و ۰/۵ گرم دی اکسید سلنیوم است) در داخل استوانه‌های هضم کجلدال ریخته شد و به آن ۱۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه گردید و در داخل دستگاه هضم کجلدال در دمای ۴۰۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت یک ساعت حرارت داده شد تا عمل هضم بر روی نمونه‌های گیاهی انجام گیرد. بعد از اتمام کار توسط دستگاه هضم و سرد شدن لوله‌ها به هر کدام ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری مقدار ۲۰ میلی‌لیتر معرف برومو کروزول گرین به اضافه‌ی اسید بوریک افزوده شد و ارلن محتوی معرف و استوانه‌ی محتوی نمونه هضم شده هم زمان در داخل دستگاه تقطیر کجلدال با محلول NaOH ۴۰ درصد تقطیر گردید. بعد از پایان عمل تقطیر محتویات استوانه دور ریخته شد و محلول جمع شده‌ی درون ارلن معرف به وسیله‌ی اسید سولفوریک ۵ درصد نرمال تیتر گردید. رنگ محلول سبز تیره بود و پایان آزمایش زمانی در نظر گرفته شد که رنگ قرمز گلی ظاهر گردید. سپس، میزان اسید مصرفی یادداشت و با استفاده از معادله (۳) درصد نیتروژن کل محاسبه شد:

$$\%T.N = T - \frac{B}{S} \times N \times \frac{14}{1000} \times 100$$ رابطه (۳)

در این رابطه T.N مقدار کل نیتروژن موجود در نمونه، T میلی‌لیتر اسید مصرفی برای تیتراسیون نمونه، B اسید مصرفی به عنوان شاهد، S وزن نمونه (گرم) و N نرمالیته اسید سولفوریک (۵٪) است. درصد پروتئین نیز از حاصل ضرب درصد نیتروژن به عدد ثابت ۵/۷۱ به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و پس از آزمون نرمال بودن (آزمون کولموگروف –

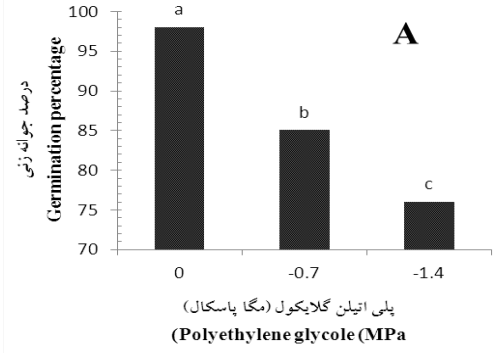
اسمیرنوف در نرم‌افزار SPSS) صورت گرفت و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

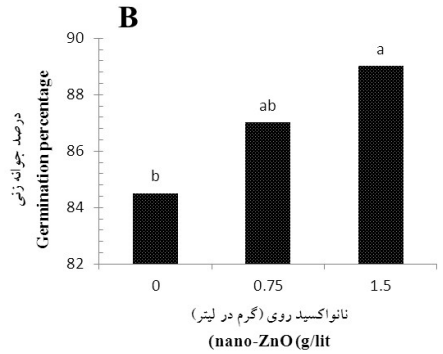
نتایج و بحث

درصد و سرعت جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده سطوح خشکی و نانو اکسید روی بر درصد و سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که درصد جوانه‌زنی با افزایش شدت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری‌که درصد جوانه‌زنی از۹۷/۱۲ درصد در شاهد به ۷۸/۰۶۷ در تنش ۱/۴- مگاپاسکال رسید (شکل ۱ a). کایا و همکاران (Kaya *et al*., 2006) گزارش کردند که با افزایش تنش خشکی درصد جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. ممکن است که اختلالات متابولیکی از جمله کند شدن هیدرولیز ترکیبات ذخیره‌ای در آندوسپرم یا لپه‌ها و یا انتقال کند مواد هیدرولیز شده برای توسعه‌ی محور جنین منجر به کاهش جوانه‌زنی شده باشد (Bradford and Nonogaki, 2007).

در این پژوهش نانو اکسید روی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی بذرهای سویا شد (شکل ۱ b) و حداکثر این صفت با مقادیر ۸۹/۵٪ بذر در روز از کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانو اکسید روی به دست آمد. نتایج لینگ و زینگ (Ling and Xing, 2007) نیز نشان‌دهنده افزایش درصد جوانه‌زنی بر اثر کاربرد نانواکسید روی بود.





شکل ۱- تأثیر خشکی ناشی از پلی اتیلن گلایکول (A) و نانو اکسید روی (B) بر درصد جوانه‌زنی بذر سویا

Figure 1. Effect of drought originated from PEG6000 (A) and Nano zinc oxide (B) on the germination percentage of soybean seeds.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نانو اکسید روی و پلی‌اتیلن‌گلایکول بر جوانه‌زنی و میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک بذر سویا

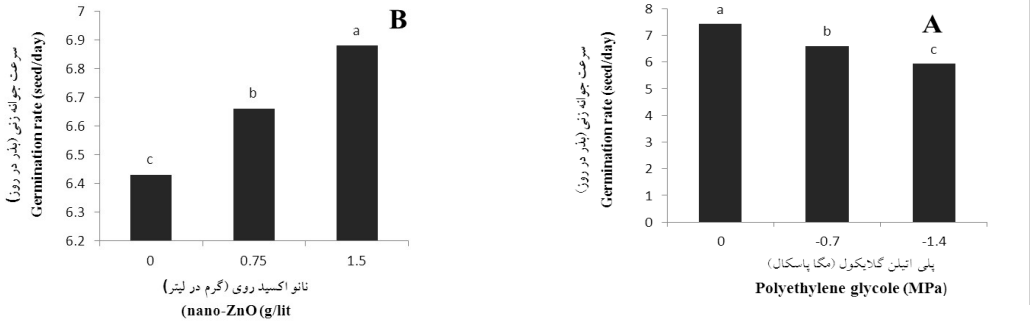
Table 1. Analysis of variance for the effect of nano zinc oxide and PEG on germination and hydrolytic enzymes activity in soybean seed.

منابع تغییر SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)						
		آمیلاز Amylase	پروتئاز Protease	لیپاز Lipase	درصد جوانه‌زنی germination percent	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	طول گیاهچه Seedling height	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight
پلی اتیلن گلیکول PEG	2	343.17**	510.32**	428.87**	63.46*	0.45**	6.98ns	0.00003ns
نانو اکسید روی Nano zinc oxide	2	84.42**	94.09**	129.32**	832.04**	5.11**	30.39 *	0.00007ns
اثر متقابل Interaction	4	0.87**	0.99**	7.22**	7.41ns	0.008ns	12.62 *	0.0001 *
خطا error	18	0.155	0.21	0.14	15.79	0.015	5.95	0.00003
CV (٪)		0.57	0.21	0.64	4.57	1.88	7.76	9.5

ns، ** و * : به ترتیب بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد است.

ns, ** and * indicate non-significant and significant difference at 1 and 5% probability level, respectively.

در این پژوهش تنش خشکی موجب کاهش سرعت جوانه‌زنی به میزان ۲۰ درصد نسبت به شاهد شد. بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۷/۴۳ بذر در روز) در تیمار شاهد دیده شد (شکل ۲ a). نانو اکسید روی موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر سویا شد (شکل ۲ b) و حداکثر آن با مقدار ۶/۸۸ بذر در روز از کاربرد ۱/۵ گرم بر لیتر نانو اکسید روی به دست آمد. با توجه به این که روی به عنوان کوفاکتور در فعال سازی تعدادی از آنزیم‌ها نقش دارد و یا بخشی از ساختمان آن‌ها به شمار می‌آید، انتظار می‌رود که این عنصر با بهبود فعالیت آنزیمی موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی شود.



شکل ۲- تاثیر خشکی ناشی از پلی اتیلن گلایکول (A) و نانو اکسید روی (B) بر سرعت جوانه‌زنی بذر سویا

Figure 2. Effect of drought originated from PEG6000 (A) and Nano zinc oxide (B) on the germination rate of soybean seeds

کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی ممکن است که به کاهش آب‌نوشی و کاهش جذب اولیه آب توسط بذر تحت شرایط تنش نسبت داده شود (Turk *et al*. 2004) و یا ناشی از اختلالات متابولیکی از جمله کند شدن هیدرولیز ترکیبات ذخیره‌ای در آندوسپرم یا لپه‌ها و یا انتقال کند مواد هیدرولیز شده برای توسعه‌ی محور جنین باشد (Muscolo *et al*., 2014). بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تحت شرایط کمبود رطوبت، فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد و در نتیجه با کاهش پتانسیل اسمزی، درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد.

طول و وزن خشک گیاهچه

اثر متقابل نانو اکسید روی و خشکی بر طول و وزن خشک گیاهچه معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین طول گیاهچه (۳۷/۶ سانتی متر) در شرایط بدون تنش و کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانو اکسید روی مشاهده شد (شکل ۳). بیشترین وزن خشک گیاهچه (۰/۰۷۶ گرم) نیز مربوط به همین تیمار بود (شکل ۴). در حضور عنصر روی یا تنش خشکی بخش عمده‌ای از ذخایر بذر صرف تولید ریشه جهت کاوش محیط برای جذب رطوبت می‌گردد. گزارش شده است که در حضور عنصر روی، سنتز هورمون‌ها و از جمله اکسین و جیبرلین افزایش می‌یابد (Cakmak, 2008). بنابراین، به نظر می‌رسد که افزایش اکسین و جیبرلین بذر همراه با حضور عنصر روی موجب افزایش رشد گیاهچه و در نتیجه افزایش وزن خشک آن گردیده است. یکی از نقش‌های اساسی روی در جوانه‌زنی بذر، افزایش رشد ریشه‌چه است (Cakmak *et al*., 1999). در شرایط تنش محیطی، به احتمال زیاد عنصر روی در ریشه برای فعالیت‌های غشا و طویل شدن سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cakmak, 2008) و در نهایت با حفظ پایداری غشا و طویل شدن سلول‌ها، موجب افزایش رشد گیاهچه می‌شود.

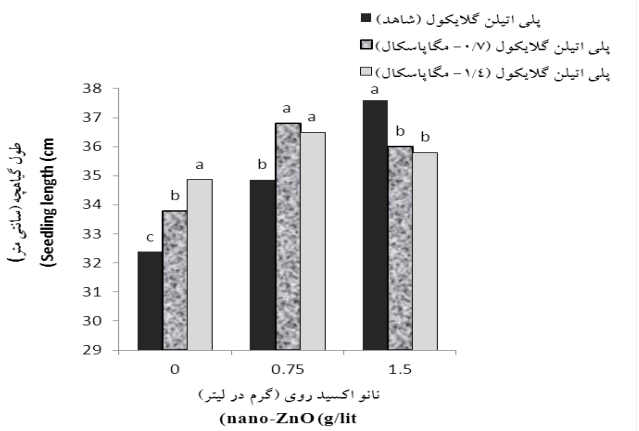
فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز تحت تاثیر برهم‌کنش تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول و نانواکسید روی قرار گرفت (جدول ۱)، به طوری که در هر سه سطح نانواکسید روی با افزایش شدت تنش خشکی از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شد، همچنین کاربرد نانواکسید روی فعالیت آلفاآمیلاز را در هر سطح از تنش به تدریج افزایش داد (شکل ۵). کوئی و همکاران (Cui *et al*., 2004) گزارش کردند که تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک از قبیل α-آمیلاز را در گیاه لوبیا کاهش می‌دهد. در زمان جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه مواد غذایی از

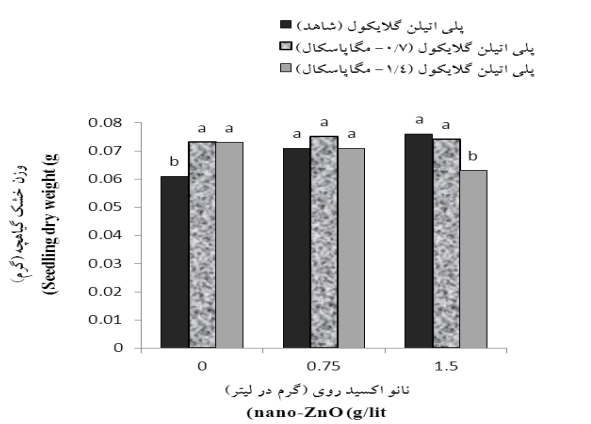
جمله کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها اکسید و انرژی حاصل از آن به صورت ATP ذخیره می‌شود. بنابراین در این زمان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دارای اهمیت زیادی می‌باشد (Muscolo *et al*., 2014). با کاهش میزان آب محیط، فعالیت این آنزیم کاسته می‌شود که در این صورت نه تنها جوانه‌زنی و سازوکارهای مربوط به آن به صورت کامل انجام نمی‌شود، بلکه ممکن است که به علت افزایش رادیکال‌های آزاد از قدرت جوانه‌زنی گیاهچه کاسته شود. از دلایل کاهش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز تحت تاثیر تنش خشکی تخریب این آنزیم بر اثر حضور ROS ذکر شده است (Yu *et al*., 2003; Oracz *et al*., 2007).

همچنین نانو اکسید روی موجب افزایش میزان فعالیت آلفاآمیلاز در شرایط تنش خشکی شد. به نظر می‌رسد که در حضور عنصر روی، سنتز هورمون‌هایی مانند اکسین و جیبرلین افزایش می‌یابد (Cakmak, 2008). جیبرلین یکی از مهمترین هورمون‌های موثر بر سنتز و فعالیت α آمیلاز و سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد. همچنین اکسین هورمونی است که سنتز آن به شدت تحت تاثیر کمبود روی کاهش می‌یابد (Khan *et al*., 2012). به نظر می‌رسد که اکسین نیز در فرایند جوانه‌زنی نقش مهمی داشته باشد (Bradford and Nonogaki, 2007). بنابراین ممکن است که روی با کمک به سنتز این دو هورمون موجب افزایش سنتز و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شده باشد.



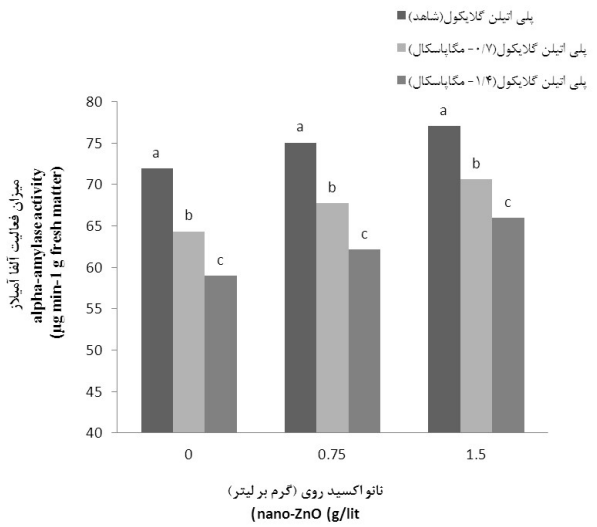
شکل ۳- مقایسه ترکیب تیماری نانو اکسید روی و تنش خشکی از نظر طول گیاهچه سویا

Figure 3. Comparison of means for interaction of nano zinc oxide and drought stress on soybean seedling length



شکل ۴- مقایسه ترکیب تیماری نانو اکسید روی و تنش خشکی از نظر وزن خشک گیاهچه سویا

Figure 4. Comparison of means for interaction of nano zinc oxide and drought stress on soybean seedling dry weight



شکل ۵- مقایسه ترکیب تیماری نانو اکسید روی و تنش خشکی بر میزان فعالیت آمیلاز در بذر سویا

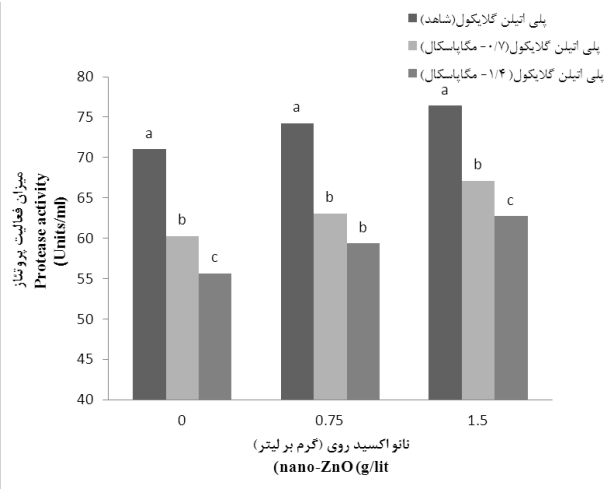
Figure 5. Comparison of means for interaction of nano zinc oxide and drought stress on amylase activity in soybean seed

فعالیت آنزیم پروتئاز

اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد نانواکسید روی بر فعالیت آنزیم پروتئاز معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز (۷۶/۴ واحد بر میلی‌لیتر پروتئین) در تیمار بدون تنش و کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانواکسید روی و کمترین مقدار آن (۵۵/۶۳ واحد بر میلی‌لیتر پروتئین) در تیمار تنش ۱/۴- مگاپاسکال و بدون مصرف نانواکسید روی مشاهده شد (شکل ۶). طی مرحله جوانه‌زنی، ترشح هورمون جیبرلین توسط جنین پس ازجذب آب و آماس انجام می‌شود. جیبرلین نیز سنتز آنزیم‌های هیدرولیتیک را القا می‌کند. با فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و پروتئاز، مواد ذخیره‌ای به مواد قابل انتقال (ساکارز و گلوکز) تبدیل و به جنین انتقال می‌یابند و عامل رشد جنین تلقی می‌شوند (Jacobsen *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد که کاهش جذب آب توسط بذر در شرایط تنش موجب کاهش ترشح هورمون‌های موثر بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه اختلال در رشد گیاهچه (شامل ریشه‌چه و ساقه‌چه) شده است (Bradford and Nonogaki, 2007). همچنین در شرایط کمبود روی و تحت تاثیر خشکی اختلالات شدیدی در گیاه اتفاق می‌افتد که می‌تواند به علت ایجاد انواع اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی باشد (Hajiboland and Amirazad., 2010). آنزیم‌های زیادی وجود دارند که از عنصر روی به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کنند و روی در فعال‌سازی تعداد زیادی از آنزیم‌های گیاهی دخیل است (Marschner., 1995). همانطور که شکل ۶ نشان می‌دهد کاربرد نانواکسید روی میزان فعالیت آنزیم پروتئاز را در حضور پلی اتیلن گلایکول افزایش داد. با توجه به این که روی می‌تواند حساسیت گیاهان را به تنش خشکی کاهش دهد (Bagci *et al*, 2007)، به احتمال زیاد این عنصر با افزایش فعالیت پروتئاز موجب بهبود تحرک ذخایر غذایی جوانه‌زنی شده است.

فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت آنزیم لیپاز تحت تاثیر برهم‌کنش تنش خشکی و نانواکسید روی قرار گرفت (جدول ۱). تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم لیپاز و نانو اکسید روی موجب افزایش فعالیت این آنزیم شد (شکل ۷). در بذرهای روغنی، نخستین گام در استفاده از مواد ذخیره‌ای، استفاده از یک واکنش هیدرولیزکننده با کمک آنزیم لیپاز است (Bradford and Nonogaki, 2007). چربی‌ها توسط آنزیم لیپاز به گلیسرول و اسیدهای چرب هیدرولیز می‌شوند و روش رایج تجزیه‌ی بیشتر اسیدهای چرب، β اکسیداسیون است که سبب شکسته شدن



شکل ۶- مقایسه ترکیب تیماری نانو اکسید روی و تنش خشکی برمیزان فعالیت پروتئاز در بذر سویا

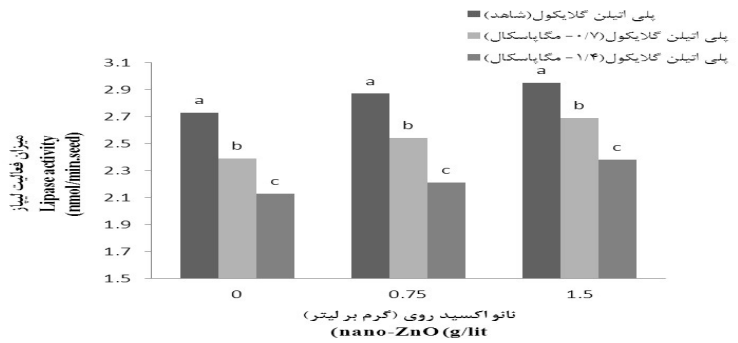
Figure 6. Comparison of means for interaction of nano zinc oxide and drought stress on protease activity in soybean seed

اسیدهای چرب به ماده‌ی دو کربنی (استیل‌کوآنزیم‌آ) وATP می‌گردد. استیل‌کوآنزیم‌آ ممکن است که برای اکسیداسیون بیشتر وارد سیکل کربس شود و ATP تولید کند (Rylott *et al.*, 2001). بنابراین در گیاه سویا که یک گیاه روغنی است فعالیت آنزیم لیپاز طی جوانه‌زنی اهمیت بسیار زیادی در تامین انرژی دارد. گاهی نیز در مواقعی که انرژی سلولی محدودکننده نیست، مواد لیپیدی وارد چرخه‌ای به نام گلی‌اکسیلات می‌شوند تا قندهای ساختمانی مورد نیاز برای رشد گیاهچه را تامین کنند (Sedghi, 2016).

با توجه به شکل ۴ میزان فعالیت آنزیم لیپاز با کاربرد نانواکسید روی در شرایط تنش خشکی افزایش یافت، به طوری که کمترین و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم (به ترتیب ۴۸/۷ و ۷۰/۴۶) بر اثر تنش ۱/۴- مگاپاسکال، بدون کاربرد نانو اکسید روی و شرایط بدون تنش به همراه کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانو اکسید روی حاصل شد. یکی از مسیرهای سیگنالی شناخته شده طی تنش اسمزی، به تجزیه فسفولیپیدها توسط فسفولیپازها و تولید پیام‌رسان-های ثانویه مربوط است (Turkan, 2011). فسفولیپیدها گروه بزرگی از لیپیدهای بذر هستند. در این میان فسفولیپاز C و فسفولیپاز D توسط جیبرلین و برخی دیگر از هورمون‌ها فعال می‌شود (Bradford and Nonogaki, 2007). بررسی‌های انجام شده نیز نشان می‌دهد که ژن‌هایی که در تولید جیبرلین دخالت دارند، به عنصر روی نیازمندند (Liu *et al.*, 2005; Penfield *et al.*, 2005) با توجه به این مطالب به نظر می‌رسد که روی موجب سنتز جیبرلین می‌شود و جیبرلین نیز لیپازها از جمله فسفولیپازها را فعال می‌کند.

میزان تحرک ذخایر

تحرک ذخایر غذایی یکی از مهمترین فرایندهای مربوط به جوانه‌زنی است که تحت تاثیر کمبود آب قرار می‌گیرد (Bradford and Nonogaki, 2007). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار تنش خشکی و نانو اکسید روی بر میزان تحرک ذخایر لیپیدی، کربوهیدرات و پروتئین‌ها در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری بود (جدول‌های ۲، ۳ و ۴). با افزایش زمان آبنوشی و تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلیکول، تحرک ذخایر کربوهیدرات کاهش نشان داد، در حالی که تیمار نانواکسید روی موجب افزایش تحرک ذخایر کربوهیدرات گردید (جدول ۵). این درحالی بود که تحرک ذخایر پروتئینی با کاربرد پلی‌اتیلن‌گلیکول و با افزایش زمان آبنوشی تا ۸۴ ساعت تغییر قابل توجهی نداشت، ولی پس از ۹۶ ساعت کاهش شدیدی پیدا کرد (جدول ۶). همچنین کاربرد نانواکسید روی تا حدودی منجر به افزایش تحرک ذخایر پروتئین شد. همانند ذخایر کربوهیدرات و ذخایر پروتئینی، تنش موجب کاهش ذخایر لیپیدی شد، ولی کاربرد نانواکسید روی موجب افزایش تحرک ذخایر لیپیدی گردید (جدول ۷). به عقیده ایراکی و همکاران (Iraki *et al.*, 1989) ممکن است که پلی-اتیلن‌گلایکول با ایجاد تنش خشکی موجب کاهش



شکل ۷- مقایسه ترکیب تیماری نانو اکسید روی و تنش خشکی بر میزان فعالیت لیپاز در بذر سویا

Figure 7. Comparison of means for interaction of nano zinc oxide and drought stress on lipase activity in soybean see

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر کربوهیدراتی بذرهای در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 2. Results of analysis of variance for the effects of nano zinc oxide and drought stress on the carbohydrate reserves mobilization in soybean seeds during germination after different intervals of planting

منابع تغییر SOV	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)														
	df	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h	132 h	144 h	156 h	168 h	180 h
پلی اتیلن گلایکول PEG600	2	2.99**	3.01**	2.80**	1.16**	3.42**	5.43**	2.25**	2.41**	2.75**	4.78**	5.55**	4.84**	2.81**	2.62*	2.46**
نانواکسیدروی Nano zinc oxide	2	0.86**	0.80**	0.36**	0.218**	0.53**	0.61**	0.64**	0.678**	0.49**	0.649**	0.7**	0.5**	0.84**	0.32**	0.59**
اثرمتقابل interaction	4	0.13**	0.008ns	0.0037ns	0.002ns	0.009ns	0.004 ns	0.018ns	0.002ns	0.007ns	0.012ns	0.015ns	0.0098ns	0.008ns	0.003ns	0.002ns
خطا Error	18	0.010	0.014	0.016	0.01	0.019	0.015	0.067	0.031	0.026	0.047	0.035	0.022	0.021	0.04	0.025
CV (٪)		0.64	0.81	0.92	0.75	1.61	1.08	2.48	1.91	1.94	3.05	2.9	2.87	3.5	5.98	8.08

ns,* و **: به ترتیب بیانگر تفاوت‌های غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

ns, ** and * indicate no significance, significant difference at 1 and 5% probability level, respectively.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر پروتئینی بذرهای در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 3. Results of analysis of variance for the effects of nano zinc oxide and drought stress on the protein reserves mobilization in soybean seeds during germination after different intervals of planting

منابع تغییر SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات(MS)														
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h	132 h	144 h	156 h	168 h	180 h
پلی اتیلن گلایکول PEG600	2	1.96**	4.87**	5.38**	5.49**	3.91**	7.28**	5.92**	11.84**	4.37**	5.68**	5.78**	8.67**	4.79**	9.87*	2.68**
نانواکسیدروی Nano zinc oxide	2	0.73**	0.88**	0.78**	1.01**	0.78**	0.78**	0.91**	1.26**	1.11**	1.36**	0.78**	0.78**	0.9**	0.96**	0.66**
اثرمتقابل interaction	4	0.016ns	0.03ns	0.025ns	0.077ns	0.008ns	0.059**	0.014ns	0.047ns	0.007ns	0.0059ns	0.017ns	0.01ns	0.035ns	0.005ns	0.015ns
خطا Error	18	0.016	0.018	0.013	0.062	0.8	0.01	0.026	0.047	0.031	0.057	0.077	0.028	0.046	0.051	0.023
CV (٪)		0.37	0.39	0.325	0.68	0.26	0.3	0.48	0.047	0.58	0.89	1.23	0.95	1.56	2.49	3.11

ns,* و **: به ترتیب بیانگر تفاوت‌های غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

ns, ** and * indicate no significance, significant difference at 1 and 5% probability level, respectively

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثرات نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر لیپیدی بذرهای در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 4. Results of analysis of variance for the effects of nano zinc oxide and drought stress on the lipid reserves mobilization in soybean seeds during germination after different intervals of planting

منابع تغییر SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات(MS)														
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	120 h	132 h	144 h	156 h	168 h	180 h
پلی اتیلن گلایکول PEG6000	2	1.13**	2.22**	5.07**	4.58**	8.01**	9.56**	9.21**	8.76**	10.58**	8.02**	7.59**	4.5**	11.52**	2.65*	1.86**
نانواکسیدروی Nano zinc oxide	2	0.43**	0.32**	0.327**	0.447**	0.38**	0.64**	0.72**	0.51**	0.877**	0.52**	0.89**	0.813**	0.97**	0.9**	0.44**
اثرمتقابل interaction	4	0.012ns	0.003ns	0.008ns	0.007ns	0.003ns	0.009ns	0.014ns	0.009ns	0.047ns	0.008ns	0.1ns	0.006ns	0.004ns	0.0037ns	0.003ns
خطا Error	18	0.012	0.014	0.012	0.021	0.01	0.027	0.012	0.022	0.032	0.024	0.054	0.049	0.037	0.018	0.035
CV (٪)		0.603	0.67	0.65	0.86	0.61	1.08	0.79	1.08	1.43	1.34	2.29	2.75	3.19	3.18	6.51

ns,* و **: به ترتیب بیانگر تفاوت‌های غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

ns, ** and * indicate no significance, significant difference at 1 and 5% probability level, respectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات ساده نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر کربوهیدراتی بذرهای در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 5. Comparison of means for the simple effects of nano zinc oxide and drought stress on the carbohydrate reserves mobilization in germinating soybean seeds at different intervals after planting

پلی اتیلن گلایکول (مگاپاسکال) PEG6000 (MPa)			نانو اکسید روی (گرم در لیتر) Nano zinc oxide (g lit^{-1})			زمان
-۱/۴ - 1.4	-۰/۷ -0.7	شاهد control	۱/۵ 1.5	۰/۷۵ 0.75	شاهد control	
16.14±0.65	15.71±0.45	15.54±0.45	15.33±0.29	15.62±0.17	16.44±0.43	12 h
14.78±0.48	14.57±0.54	14.2±0.49	13.96±0.27	14.47±0.3	15.12±0.26	24 h
13.97±0.5	13.8±0.47	13.57±0.5	13.31±0.2	13.64±0.23	14.4±0.19	36 h
13.41±0.3	13.24±0.32	13.1±0.33	12.85±0.15	13.34±0.18	13.55±0.13	48 h
12.45±0.55	12.18±0.52	11.96±0.56	11.58±0.21	12.2±0.28	12.82±0.23	60 h
11.8±0.68	11.53±0.7	11.27±0.65	10.84±0.25	11.38±0.26	12.37±0.24	72 h
10.71±0.41	10.44±0.54	10.17±0.49	9.94±0.32	10.44±0.23	10.94±0.4	84 h
9.57±0.63	9.36±0.62	9.03±0.61	8.61±0.27	9.35±0.3	10.01±0.21	96 h
8.56±0.45	8.32±0.5	8.1±0.53	7.74±0.28	8.4±0.22	8.84±0.22	108 h
7.35±0.64	7.14±0.64	6.28±0.69	6.35±0.31	7.15±0.36	7.81±0.2	120 h
6.72±0.64	6.54±0.7	6.17±0.74	5.73±0.31	6.41±0.33	7.3±0.22	132 h
5.42±0.68	5.2±0.64	4.95±0.61	4.47±0.22	5.15±0.23	5.94±0.26	144 h
4.46±0.49	4.15±0.45	3.85±0.55	3.56±0.35	4.23±0.25	4.67±0.27	156 h
3.55±0.46	3.34±0.51	3.17±0.51	2.76±0.2	3.48±0.19	3.82±0.3	168 h
2.21±0.46	1.97±0.45	1.7±0.5	1.4±0.26	2.05±0.25	2.43±0.26	180 h

میانگین‌ها بر حسب درصد و به همراه خطای استاندارد آورده شده‌اند

Means are presented in percent with standard error.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات ساده نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر پروتئینی بذور در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 6- Comparison of means for the simple effects of nano zinc oxide and drought stress on the protein reserves mobilization in germinating soybean seeds at different intervals after planting

پلی اتیلن گلایکول (مگاپاسکال) PEG6000 (MPa)			نانو اکسید روی (گرم در لیتر) Nano zinc oxide (g lit^{-1})			زمان
-۱/۴ - 1.4	-۰/۷ -0.7	شاهد control	۱/۵ 1.5	۰/۷۵ 0.75	شاهد control	
34.75±0.36	34.52±0.46	34.18±0.43	34.02±0.29	34.48±0.28	34.95±0.25	12 h
35.06±0.57	34.82±0.62	34.44±0.74	34.07±0.38	34.71±0.31	35.54±0.18	24 h
36.25±0.68	35.92±0.74	35.66±0.62	35.26±0.24	35.78±0.25	36.78±0.32	36 h
36.9±0.64	36.48±0.82	36.23±0.67	35.9±0.3	36.31±0.49	37.41±0.31	48 h
36.45±0.53	36.15±0.57	35.86±0.62	35.44±0.31	36.28±0.26	36.74±0.22	60 h
34.83±0.72	34.56±0.74	34.24±0.89	33.56±0.39	34.74±0.15	35.33±0.26	72 h
33.93±0.68	33.67±0.68	33.3±0.78	32.88±0.36	33.52±0.29	34.5±0.27	84 h
32.5±0.95	32.21±1.02	31.75±1.06	31.05±0.39	32.06±0.48	33.34±0.24	96 h
30.66±0.64	30.37±0.63	29.96±0.59	29.67±0.29	30.26±0.35	31.06±0.36	108 h
27.24±0.71	26.83±0.68	26.46±0.74	26.04±0.37	26.86±0.41	27.63±0.4	120 h
22.86±0.72	22.54±0.75	22.27±0.72	21.82±0.29	22.45±0.29	23.41±0.44	132 h
17.9±0.84	17.56±0.86	17.31±0.88	16.66±0.34	17.48±0.25	18.62±0.28	144 h
14.06±0.64	13.72±0.61	13.43±0.72	13.07±0.38	13.62±0.29	14.52±0.33	156 h
9.4±0.91	9.08±0.91	8.74±0.93	8.05±0.3	9.04±0.33	10.13±0.39	168 h
5.21±0.49	4.95±0.47	4.66±0.5	4.35±0.28	5.04±0.2	5.43±0.32	180 h

میانگین‌ها بر حسب درصد و به همراه خطای استاندارد آورده شده‌اند

Means are presented in percent with standard error

جدول ۷-مقایسه میانگین اثرات ساده نانو اکسید روی و تنش خشکی بر تحرک ذخایر لیپیدی بذور در حال جوانه‌زنی سویا در زمان‌های مختلف کشت بذر

Table 7. Comparison of means for the simple effects of nano zinc oxide and drought stress on the lipid reserves mobilization in germinating soybean seeds at different intervals after planting

پلی اتیلن گلایکول (مگاپاسکال) PEG6000 (MPa)			نانواکسید روی (گرم در لیتر) Nano zinc oxide (g lit^{-1})			زمان
-۱/۴ - 1.4	-۰/۷ -0.7	شاهد control	۱/۵ 1.5	۰/۷۵ 0.75	شاهد control	
18.51±0.31	18.36±0.3	18.07±0.35	17.96±0.26	18.31±0.16	18.67±0.21	12 h
17.56±0.7	17.42±0.65	17.58±0.45	17.32±0.19	17.73±0.2	18.31±0.19	24 h
17.56±0.7	17.42±0.65	17.18±0.61	16.66±0.15	17.34±0.18	18.16±0.23	36 h
17.08±0.61	16.9±0.61	16.64±0.66	16.23±0.25	16.75±0.25	17.64±0.18	48 h
16.68±0.82	16.52±0.79	16.27±0.85	15.64±0.21	16.33±0.2	17.51±0.19	60 h
15.64±0.88	15.36±0.89	15.11±0.94	14.5±0.26	15.11±0.34	16.51±0.2	72 h
14.96±0.94	14.38±0.83	14.1±0.87	13.4±0.21	14.13±0.27	15.42±0.42	84 h
14.14±0.82	13.91±0.86	13.66±0.9	12.87±0.27	14±0.25	14.84±0.2	96 h
12.96±0.87	12.7±0.92	12.34±1.05	11.5±0.43	12.73±0.22	13.72±0.28	108 h
11.76±0.8	11.57±0.81	11.28±0.86	10.6±0.27	11.54±0.26	12.48±0.2	120 h
10.51±0.76	10.28±0.83	9.88±0.85	9.34±0.36	10.16±0.29	11.17±0.36	132 h
8.38±0.64	8.12±0.64	7.78±0.63	7.3±0.35	8.35±0.28	8.64±0.33	144 h
6.36±0.98	6.08±0.99	5.71±1	4.83±0.33	6.26±0.3	6.07±0.35	156 h
4.6±0.45	4.25±0.49	3.96±0.5	3.7±0.31	4.34±0.28	4.77±0.29	168 h
3.11±0.42	2.9±0.42	2.66±0.43	2.43±0.26	2.9±0.26	3.34±0.22	180 h

میانگین‌ها بر حسب درصد و به همراه خطای استاندارد آورده شده‌اند.

Means are presented in percent with standard error

هیدرولیز مواد اندوخته‌ای دانه و در نتیجه کاهش جوانه-زنی شود. همچنین، تنش می‌تواند منجر به افزایش سطح ABA گردد (Turkan, 2011)، به نظر می‌رسد که افزایش سطح ABA یکی از دلایل اصلی کاهش تحرک ذخایر غذایی طی جوانه‌زنی باشد (Penfield *et al*., 2004). از آنجایی که تنش خشکی با محدود کردن جذب آب توسط بذر، بر حرکت و انتقال ذخایر بذر تأثیر می-گذارد و یا با تأثیر مستقیم بر ساختمان آلی و سنتز پروتئین در جنین، جوانه‌زنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Dodd and Donovan, 1999) و با توجه به نتایج ذکر شده در مورد فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز، لیپاز و پروتئاز به نظر می‌رسد که کاهش تحرک مواد غذایی ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک بر اثر خشکی باشد.

همانطور که نتایج نشان می‌دهد تحرک کربوهیدرات، پروتئین و لیپیدها طی زمان نیز کاهش یافت و بیشترین میزان تحرک این مواد در ساعات اولیه و روزهای نخست جوانه‌زنی اتفاق افتاد (جدول‌های ۵، ۶ و ۷). به نظر می-رسد که با گذشت زمان و رشد گیاهچه علاوه بر کاهش ذخایر غذایی، با به وجود آمدن قسمت‌های سبز و فتوسنتزکننده، تحرک ذخایر غذایی کاهش می‌یابد. همچنین در حین جوانه‌زنی، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌های موجود ذخیره شده به سرعت تجزیه و به نقاط رشد، منتقل می‌شوند (Pessarakli, 2011). بنابراین با گذشت زمان اندوخته کمتری برای انتقال باقی می‌ماند که کاهش انتقال مواد بر اثر زمان ممکن است که به همین دلیل باشد. اشرف و وحید (Ashraf and Vahid, 2000) نیز عنوان کردند که خشکی سبب محدود شدن ذخایر قندهای محلول و در نتیجه اختلال در متابولیسم تنفس رشد جنین می‌شود.

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاربرد نانواکسید روی بر میزان تحرک ذخایر قندهای محلول بود. از آنجایی که جیبرلین یکی از مهمترین هورمون‌هایی است که برای تحرک ذخایر غذایی ضروری می‌باشد (Woodger *et al*., 2004) و روی در فعالیت این هورمون نقش مهمی ایفا می‌کند (Cakmak, 2008) به نظر می‌رسد که کاربرد روی با تاثیر بر هورمون‌های گیاهی از جمله جیبرلین، موجب بهبود تحرک ذخایر غذایی شده باشد. کائور و همکاران (Kaur *et al*., 1998) نیز بیان کردند که جیبرلین به رشد گیاه در شرایط تنش اسمزی کمک می‌کند.

همچنین چاکماک و مارشنر (Cakmak and Marchner, 1985) بیان کردند که وظیفه اصلی روی محافظت از پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی از تخریب ناشی از رادیکال سوپراکسید می‌باشد. زیرا روی یکی از اجزای اصلی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است (Lopez-Millan *et al*., 2005). بنابراین، روی با جلوگیری از تخریب پروتئین، لیپید و کربوهیدرات‌ها موجب بهبود انتقال آنها می‌شود. همچنین با توجه به این که روی در بسیاری از سیستم‌ها-ی آنزیمی گیاه نقش کاتالیزور فعال کننده یا ساختمانی دارد (Brown *et al*., 1993)، با بهبود کارکرد و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک موجب می‌شود تا هیدرولیز مواد در شرایط تنش بهبود یابد و تحرک ذخایر با سرعت بیشتری انجام گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاربرد نانواکسید روی بر درصد جوانه‌زنی، فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز، لیپاز و پروتئاز بود. همچنین کاربرد نانواکسید روی با کاهش آسیب‌های ناشی از تنش خشکی موجب افزایش تحرک پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها شد. همچنین با افزایش غلظت نانواکسید روی بر تاثیر آن افزوده شد به طوری که کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانواکسید روی بیشترین تاثیر را بر تمام صفات اندازه‌گیری شده داشت. تنش خشکی موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و تحرک ذخایر غذایی شد. به نظر می‌رسد که کاهش جذب آب بر اثر تنش موجب تخریب ماکرومولکول‌ها می‌شود و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک را کاهش می‌دهد و با کاهش فعالیت این آنزیم‌ها تحرک ذخایر غذایی نیز کاهش پیدا می‌کند. همچنین با افزایش مدت زمان جوانه‌زنی تحرک قندها، پروتئین‌ها و لیپیدها کاسته شد که علت آن می‌تواند تحرک بیشتر در زمان‌های نخست جوانه‌زنی و کاهش اندوخته باقی‌مانده برای انتقال باشد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که کاربرد ۱/۵ گرم در لیتر نانواکسید روی علاوه بر بهبود آسیب‌های ناشی از تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌شود و میزان تحرک ذخایر غذایی را افزایش می‌دهد. در نتیجه این شرایط، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه تحت تنش خشکی بهبود پیدا می‌کند

منابع

Alyari, H., Shekari, F. and Shekari, F. 2000. Oilseeds. Cultivation and Physiology. Amidi Publications. Tabriz, Iran, 182p. **(Book)**

Ashraf, M. and Vahid, S. 2000. Time–course changes in organic metabolites and mineral nutrients in germinating maize seeds under salt (NaCl) stress. Seed Science and Technology, 28(3): 641-656. (In Persian)**(Journal)**

Bagci, S. A., Ekiz, H., Yilmaz, A. and Cakmak, I. 2007. Effect of Zn deficiency and drought on grain yield of field grown wheat cultivars in Central Anatolia. Journal of Agronomy and Crop Science, 193: 198–206. **(Journal)**

Bennett, J. P. and Skoog, F. 2002. Preliminary experiments on the relation of growth-promoting substances to the rest period in fruit trees. Plant Physiology, 13(2): 219–225. **(Journal)**

Bradford, K. J. and Nonogaki, H. 2007. Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing Ltd. 389pp. **(Book)**

Brown, P. H., Cakmak, I. and Zhang, Q. 1993. Form and function of zinc in plants, In: Robson, A. D. (Ed.). Pp: 93-106. **(Book)**

Cakmak, I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification. Plant and Soil*,* 30(2): 1-17. **(Journal)**

Cakmak, I. and Marschner, H. 1985. Mechanism of phosphorous induced zinc deficiency in cotton. I. zinc deficiency enhanced uptake rate of phosphorous. Physilogiae Plantareum, 68: 483-490. **(Journal)**

Cakmak, I., Kalayci, M., Brauni, H. J., Kilinc, Y. and Yilmaz, A. 1999. Zn deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A Nato-Science for stability project. Field Crop Research, 60: 175-188. **(Journal)**

Cui, Y. Y., Pandey, D. M., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2004. Effect of drought on physiological aspects of Crassulacean acid metabolism in Doritaenopsis. Plant Science, 167: 1219-1226. **(Journal)**

Dodd, G. L. and Donovan, L. A. 1999. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. American Journal of Botany, 86:1146-153. **(Journal)**

Doman, D. C., Walker, J. C., Trelease, R. N. and Moore, B. D. 1982. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves in germinated cotton seeds. Planta, 155(6): 502-510. **(Journal)**

Ellis, R. H. and Roberts, E. H. 1981. The quantification of aging and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology, 9: 373-409. **(Journal)**

Graham, R. D., Alscher, J. S. and Haynes, S. C. 1992. Selecting Zinc-efficient cereals genotypes for soils of low Zn status. Plant and Soil, 146: 241-250. **(Journal)**

Gubler, F., Millar, A. A. and Jacobsen, J. V. 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. Current Opinion in Plant Biology**.** 8: 183–187. **(Journal)**

Gupta, V. K. and Gupta, S. P. 1984. Effect of zinc sources and levels on the growth and Zn nutrition of soybean (*Glycine max* L.) in the presence of chloride and sulphate salinity. Plant and Soil, 81: 299–304. **(Journal)**

Hajiboland, R. 2012. Effect of micronutrient deficiencies on plant stress responses. In: Abiotic Stress Responses in Plants (eds. Ahmad, P. and Prasad, M. N. V) pp. 283-329. Springer, USA. **(Book)**

Hajiboland, R. and Amirazad, F. 2010. Drought tolerance in Zn-deficient red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra) plants. Horticultural Sciences, 37: 88–98. **(Journal)**

Holwerda, B. C. and Rogers, J. C. 1992. Purification and characterization of aleurain. Plant Physiology, 99: 848-855. **(Journal)**

Huang, A. H. C. 1985. Lipid bodies, in: Linskins HF & Jackson F (eds). Modern Methods of Plant Analysis. Berlin: Springer Verlag. 145-151. **(Book)**

Iraki, S. N., Bressan, R. A. and Carpita, N. C. 1989. Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and slain stress. Plant Physiology, 91: 48-53. **(Journal)**

Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plants. Physiologia Plantarum, 84: 55-60. **(Journal)**

Jacobsen, D. W., Pearce, A., Poole, T., Pharis, R. P. and Mander, L. N. 2002. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. Physiologia Plantarum, 115: 428–441. **(Journal)**

Kaur, S., Gupta, A. K. and Kaur, N. 1998. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth. Plant Growth Regulation, 25: 29-33. **(Journal)**

Kaya, M. D., Okcu, G., Atak, M., Cıkılı, Y. and Kolsarıcı, O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy, 24: 291-295. **(Journal)**

Khan, N. A., Nazar, R., Iqbal, N. and Anjum, N. A. 2012. Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 311pp. **(Book)**

Kim, Y. C., Nakajima, M., Nakayama, A. and Yamaguchi, I. 2005. Contribution of gibberellins to the formation of *Arabidopsis* seed coat through starch degradation. Plant and Cell Physiology**.** 46: 1317–1325. **(Journal)**

Klee, H. and Estelle, M. 1991. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42: 529–551. **(Journal)**

Kwak, J. M., Mori, I. C. and Pei, Z. M. 2003. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. The EMBO Journal, 22: 2623–2633. **(Journal)**

Ling, D. and Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution, 150: 243-250. **(Journal)**

Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallo´ czy, Z., Levine, B. and Dinesh-Kumar, S. P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. Cell, 121: 567–577. **(Journal)**

Lopez-Millan, A. F., Ellis, D. R. and Grusak, A. 2005. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants. Plant Science, 168: 1015–1022. **(Journal)**

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Academic Press. Ltd. London. pp 889. **(Book)**

Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology, 51: 914-916. **(Journal)**

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7: 405–409. **(Journal)**

Mousavi Nik, S. M., Gholami Tilebeni, H., Zeinali, E. and Tavassoli A. 2011. Effects of seed ageing on heterotrophic seedling growth in Cotton. Emerica-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 10(4): 653-657. **(Journal)**

Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C. and Maggio, A. 2014. Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. Journal of Plant Interactions, 9(1): 354-363. **(Journal)**

Ober, E. S. and Sharp, R. E. 2003. Electrophysiological responses of maize roots to low water potentials: relationship to growth and ABA accumulation. Journal of Experimental Botany, 54 (383): 813-824. **(Journal)**

Oracz, K., Bailly, C., Gniazdowska, A., Côme, D., Corbineau, D. and Bogatek, R. 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. Journal of Chemical Ecology, 33: 251-264. **(Journal)**

Penfield, S., Josse, E. M., Kannangara, R., Gilday, A. D., Halliday, K. J. and Graham, I. A. 2005. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. Current Biology, 156(1): 1998–2006. **(Journal)**

Pessarakli, M. 2011. Handbook of Plant and Crop Physiology. Second Edition Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved.997 P. **(Book)**

Pucciariello, C., Banti, V. and Perata, P. 2012. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. Plant Physiology and Biochemistry, 59: 3 -10. **(Journal)**

Rylott, E. L., Hooks, M. A. and Graham, I. A. 2001. Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical Society Transactions, 29: 283–287. **(Journal)**

Sedghi, M. 2016. Plant biochemistry. Publications of the University of Mohaghegh Ardabili, Iran. P: 420. **(Book)**

Srinivasara, C. H., Wani, S. P., Sahrawat, K. L., Rego, T. J. and Pardhasaradhi, G. 2008. Zinc, boron and sulphur deficiencies are holding back the potential of rain fed crops in semi-arid India: Experiments from participatory watershed management. International Journal of Plant Production, 2(1): 89-99. **(Journal)**

Turk, M. A, Rahmsn, A., Tawaha, M. and Lee, K. D. 2004. Seed germination and seedling growth of three lentil cultivars under moisture stress**.** Asian Journal of Plant Sciences, 3: 394-397. **(Journal)**

Turkan, I. 2011. Plant responses to drought and salinity stress: Development in a post-genomic era. Academic press. New York. **(Book)**

Waraich, E. A., Amad, R., Ashraf, M., Saifullah, Y. and Ahmad, M. 2011. Improving agricultural water use efficiency by nutrient management. Acta Agriculturae Scandinavica, 61(4): 291-304. **(Journal)**

Woodger, F., Jacobsen, J. V. and Gubler, F. 2004. Gibberellin action in germinating cereal grains. In: Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, and Action. (Ed. P.J. Davies), pp. 221–240. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. **(Book)**

Yu, J. Q., Fye, S., Zhang, M. F. and Hu, W. H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extract of cucumber and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biological Systems and Ecology, 31: 129-139. **(Journal)**

Effect of nano-zinc oxide and drought stress on the activity of hydrolytic enzymes and seed reserves mobilization of soybean (*Glycine max* L.) Cultivar Katul (DPX)

Mohammad Sedghi[*1] and Sahar Tolouie[2]

Received: July 16, 2017 Accepted: September 10, 2017

Abstract

To evaluate the effect of drought stress originated from poly ethylene glycol and application of nano ZnO on the activity of hydrolytic enzymes and soybean seed reserves mobilization a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with three replications at the University of Mohaghegh Ardabili in 2016. Treatments were drought stress at three levels as 0, -0.7 and -1.4 MPa and nano zinc oxide at the concentrations of 0, 0.75 and 1.5 g lit^{-1}. Germination percentage and rate, seedling length and dry weight, activity of hydrolytic enzymes (alpha-amylase, protease and lipase) and seed reserves (carbohydrate, protein and lipid) mobilization were measured. Results showed that nano zinc oxide had the positive effect on germination percentage and rate, activity of hydrolytic enzymes and mobilization of carbohydrate, lipid and protein reserves. So that application of 1.5 g lit^{-1} of nano ZnO increased the activity of lipase, protease and α-amylase about 11.75, 12.75 and 11.87%, respectively in severe drought stress compared to non-stress condition. Drought stress also decreased the seed reserves mobilization in addition to reducing the activity of hydrolytic enzymes. There was a reduction trend in the mobilization of carbohydrates, lipids and proteins under drought stress with the increasing in imbibition time, while application of nano ZnO increased the mobilization of seed reserves which is the indicator of growth and production of higher seedling dry weight. Considering the ameliorative effect of nano ZnO on the damages due to drought stress and increasing the seed reserves using efficiency, activity of hydrolytic enzymes and germination percentage it seems that application of nano ZnO in the concentration of 1.5 g lit^{-1} will improve the soybean seed germination under drought conditions.

Keywords: α-Amylase; Lipase; Protease; Seed reserves mobilization

How to cite this article
Sedghi, M. and Tolouie, S. 2018. Effect of nano-zinc oxide and drought stress on the activity of hydrolytic enzymes and seed reserves mobilization of soybean (*Glycine max* L.) Cultivar Katul (DPX). Iranian Journal of Seed Science and Research, 5(3): 1-18. (In Persian)**(Journal)**
DOI: 10.22124/ims.2018.2931

COPYRIGHTS
Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research
The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Assistant Professor, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
*Corresponding author's Email: m_sedghi@uma.ac.ir