تحقیقات آب و خاک ایران، دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۴ (ص ۷۳۷-۷۲۷)

ارزیابی کارایی مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی (ANN) در پیش‌بینی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شاخسارهٔ گندم نان (*Triticum aestivum*) تحت سمیت کادمیم

ایمان جوادزرین[۱] و بابک متشرع‌زاده[۲*]

۱، ۲. کارشناس‌ارشد و دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

(تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۷/۹- تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۴/۲۳)

چکیده

هدف از انجام این تحقیق مقایسهٔ کارایی مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی (ANN) جهت پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POX) در شاخسارهٔ گندم (*aestivum Triticum*) رقم الوند در خاک آلوده به کادمیم بود. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح کادمیم (صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم خاک) بود. پس از گذشت ۳۰ روز (هم‌زمان با مرحلهٔ به ساقه رفتن) اقدام به برداشت نمونه‌ها و اندازه‌گیری ده پارامتر مختلف شامل وزن تر و خشک، غلظت کلروفیل‌های a و b، غلظت عناصر کادمیم، مس، آهن، منگنز، روی و پتاسیم شد. همچنین، مقدار فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX و POX اندازه‌گیری شد. در مرحلهٔ بعد ضرایب همبستگی بین پارامترهای ده‌گانه و مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تعیین شد. نتایج حاصل از مدل‌های بهینه‌شدهٔ رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی نشان داد که کارایی مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های SOD و POX بیش از مدل رگرسیون چندمتغیره بود. ضرایب همبستگی (r^2) بین مقادیر اندازه‌گیری‌شده و پیش‌بینی‌شدهٔ فعالیت آنزیم SOD برای مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۸۷ بود. ضرایب همبستگی آنزیم POX برای مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۹۸ بود. ضرایب همبستگی بین مقادیر اندازه‌گیری‌شده و پیش‌بینی‌شدهٔ فعالیت آنزیم CAT برای مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۸ بود. در رابطه با آنزیم APX این ضرایب برای مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۹ بود. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت کارایی مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شاخسارهٔ رقم الوند تحت سمیت کادمیم به طور کلی بیش از مدل رگرسیون چندمتغیره بود.

کلیدواژگان: آلودگی خاک، فلزات سنگین، مدل‌سازی.

مقدمه

آلودگی ناشی از فلزات سنگین به نگرانی زیست‌محیطی در مقیاس جهانی تبدیل شده است. دلایل این نگرانی‌ها مربوط به سمیت بالای این فلزات، پایداری آن‌ها در محیط زیست برای سال‌های طولانی و قابلیت تجمع این فلزات در سلول‌های موجودات زنده و به دنبال آن افزایش مقدار فلزات سنگین در زنجیرهٔ غذایی است (Xu *et al*., 2012). کادمیم از جمله سمی‌ترین فلزات سنگین است که قابلیت انحلال آن در آب بالاست. این عنصر جزء عناصر ضروری برای گیاه نیست، اما به سهولت جذب ریشه‌های گیاه می‌شود و سبب بروز علایم سمیت از قبیل کاهش رشد، جلوگیری از فتوسنتز، توقف فعالیت آنزیم‌ها، اختلال در روابط آب و تغییر در ساختار دیوارهٔ سلولی می‌شود (Xu *et al*., 2012). اولین پاسخ گیاهان به محض اینکه در معرض سطوح بالای فلزات سنگین از قبیل کادمیم قرارمی‌گیرند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن[۱] (ROS) است. سمیت فلزات سنگین به طور مستقیم از طریق واکنش هابر-ویس[۲] منجر به تولید ROS و تنش اکسایشی[۳] در گیاهان می‌شود.

سازوکارهای غیرمستقیم اثرگذاری این فلزات نیز شامل برهم‌کنش با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اختلال در زنجیرهٔ انتقال الکترون یا اختلال در سوخت‌وساز عناصر غذایی گیاهان است. البته، گیاهان راهکارهایی را جهت مقابله با آثار مخرب سمیت

* نویسنده مسئول: moteshare@ut.ac.ir

1. Reactive Oxygen Species (ROS)
2. Haber-Weiss
3. Oxidative Stress

فلزات سنگین در طول تکامل توسعه داده‌اند (Gill and Tuteja, 2010). تعادلی که بین تولید و حذف ROS در گیاهان وجود دارد، بر اثر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل شوری، تابش فرابنفش، خشکی، فلزات سنگین، درجهٔ حرارت‌های بالا، کمبود عناصر غذایی، آلودگی هوا، حملهٔ آفات و بیماری‌ها دچار اختلال می‌شود. چنین اختلالاتی منجر به افزایش ناگهانی ROS در درون سلول می‌شود که ترکیباتی بسیار واکنش‌پذیرند و باعث آسیب‌رساندن به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، ساختار دی‌ان‌ای و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Hsu and Kao, 2007). این آثار منجر به کمبود یا عدم توازن عناصر غذایی در درون گیاه می‌شود (Dudka and Piotrowska, 1996). برای مثال، مشخص شده است که غلظت عناصر آهن، منگنز و مس در شاخساره برنج در حضور کادمیم کاهش می‌یابد (Gussarson *et al*., 1996). دلیل این امر که در اکثر تحقیقات نیز گزارش شده است، تشابه خواص فیزیکی و شیمیایی کادمیم و کاتیون‌های دو ظرفیتی است (Aravind and Prasad, 2005). از طرفی، این عنصر بر صفات رویشی گیاه از قبیل ارتفاع بوته، وزن تر، وزن خشک و سطح برگ آثار نامطلوبی دارد (Hassan *et al*., 2006). کاهش فتوسنتز در حضور کادمیم به واسطهٔ آثار مخرب این عنصر بر ساختار کلروفیل‌های a و b است (Vassilev and Yordanov, 1997). این عنصر در بین فلزات سنگین نقش مهمی در آلودگی اراضی کشاورزی و تهدید امنیت غذایی دارد (Parchami *et al*., 2011).

طی چهار دههٔ گذشته در کشور به طور متوسط ۱۰۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار کود سوپرفسفات مصرف شده است. مقدار کادمیم استخراج شده با استفاده از اسید نیتریک به ازای هر کیلوگرم فسفر حاصل از این کود ۷/۶ میلی‌گرم بوده است (Jalali and Khanlari, 2008). فلزات سنگین را پروتئین‌های ناقل در کورتکس ریشه جذب می‌کنند و به دلیل محدودبودن تعداد جایگاه‌های تبادلی در این پروتئین‌ها بین کادمیم و دیگر عناصر غذایی از قبیل مس، آهن، منگنز و روی رقابت در جذب به‌وجود می‌آید (De Maria *et al*., 2011). این فلزات پس از عبور از پروتئین‌های ناقل به شاخسارهٔ گیاهان نیز منتقل می‌شود، اما سلول‌های گیاهان نیز با استفاده از راهکارهایی از قبیل کلات‌کردن فلزات با فیتوکلات‌ها، ترسیب فلزات در درون واکوئل‌ها و دیوارهٔ سلولی و استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تا حدودی آثار مخرب این فلزات را کاهش می‌دهند (De Maria *et al*., 2011). کادمیم سبب بروز تنش اکسایشی می‌شود، به این صورت که در سطوح بالای کادمیم، ROS تولید می‌شود که به پراکسایشی لیپید موجود در غشای سلول‌های برگ و ریشه منجر می‌شود. مقادیر بیش از حد ROS سبب آسیب ساختار لیپیدها، پروتئین و DNA سلول‌ها می‌شود. گیاهان نیز با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POX) ROS را حذف می‌کنند (Cherif *et al*., 2011). SOD اولین خط دفاعی سلول در برابر تنش اکسایشی است. بر اساس نوع فلز موجود در ساختار SOD، سه ایزوآنزیم شامل Cu/Zn-SOD، Fe-SOD و Mn-SOD وجود دارد (Mohamdi *et al*., 2010). از بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، CAT بالاترین کارایی را در مقابله با تنش اکسایشی دارد، به طوری که یک مولکول CAT تا شش میلیون مولکول پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) را در یک دقیقه حذف می‌کند (Gill and Tuteja, 2010). این آنزیم H_2O_2 حاصل از فعالیت آنزیم SOD را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (Gill and Tuteja, 2010). به‌طور کلی، در تحقیقات متعددی که به بررسی مقدار فعالیت آنزیم CAT تحت سمیت کادمیم پرداخته‌اند، نتایج متناقضی از کاهش و افزایش فعالیت این آنزیم گزارش شده است (Cho and Seo, 2005; Koji *et al*., 2009; Gill and Tuteja, 2010). آنزیم APX سبب احیای H_2O_2 می‌شود. ویژگی بارز این آنزیم، کاهش سریع کارایی آن در حضور H_2O_2 است (Hsu and Kao, 2007). آنزیم POX نیز مانند آنزیم APX سبب حذف H_2O_2 می‌شود، با این تفاوت که با اکسایش پیش‌ماده‌ای مانند ترکیبات فنولیک، H_2O_2 را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (Hsu and Kao, 2007). شدت واکنش این آنزیم‌ها در برابر تنش کادمیم، با توجه به گونه گیاهی و بافت مورد بررسی متفاوت است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با توجه به غلظت کادمیم ممکن است متوقف یا تحریک شود. در واقع، قبل از بروز علایم سمیت کادمیم و کاهش عملکرد محصولات زراعی، فعالیت این آنزیم‌ها تغییر خواهد کرد (Cherif *et al*., 2011). افزایش فعالیت آنزیم SOD در حضور کادمیم در محصولات زراعی از قبیل برنج و ذرت گزارش شده است (Nagamiya *et al*., 2007; Polidoros and Scandalios, 1999). در بررسی فعالیت آنزیم CAT در برنج مشخص شده بود که فعالیت این آنزیم تحت تنش شوری افزایش می‌یابد (Nagamiya *et al*., 2007). افزایش فعالیت آنزیم APX تحت سمیت کادمیم در ارقام مختلف گندم را محققان نیز گزارش کرده‌اند (Khan *et al*., 2007). بعضی محققان افزایش فعالیت آنزیم POX را در حضور کادمیم در گندم گزارش کرده‌اند (Milone *et al*., 2003).

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها اولین خط دفاعی گیاهان در برابر تنش اکسایشی است و روشی کارآمد در ارزیابی سطح

تنش محسوب می‌شود. اما زمانی که هدف، ارزیابی کلی و سریع سطح تنش باشد، سنجش فعالیت این آنزیم‌ها از نظر هزینه و زمان به‌صرفه نیست. روش جایگزین استفاده از مدل‌های پیش‌بینی‌کننده از قبیل رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی[1] (ANN) است. مدلی از شبکهٔ عصبی از نوع پرسپترون چندلایه[2] (MLP) به طور معمول شامل سه لایهٔ ورودی، مخفی و خروجی است. در هر لایه یک یا چند عنصر پردازشگر (نورون) وجود دارد که عملکرد آن‌ها شبیه به عملکرد نورون‌های مغز انسان است. شبکهٔ عصبی مجموعه‌ای از نورون‌هایی است که در آن هر نورون با همهٔ نورون‌های لایهٔ بعدی در ارتباط است. مقادیر ورودی به هر یک از نورون‌ها در لایهٔ ورودی در وزن مشخصی ضرب می‌شود. ماتریس وزن‌ها تعیین‌کنندهٔ تأثیر هر یک از متغیرهای ورودی بر مقادیر خرورجی از لایهٔ ورودی است. هر نورون شامل دو بخش است. در بخش اول، مجموعهٔ وزن‌دارشدهٔ مقادیر ورودی محاسبه می‌شود. در بخش دوم این مقادیر به‌عنوان ورودی در تابع ریاضی که تابع انتقال[3] نامیده می‌شود قرارمی‌گیرد و خروجی نورون محاسبه می‌شود (Keshavarzi and Sarmadian, 2010). پژوهش‌های قبلی اثبات کرده است که شبکهٔ پرسپترون چندلایه با الگوریتم یادگیری پس‌انتشار خطا بیشترین کاربرد را در پیش‌بینی و تخمین خروجی‌های مورد نظر دارد (Rabunal and Dorrado, 2006; Hecht, 1987). رگرسیون چندمتغیره جزء مدل‌های ریاضیاتی محسوب می‌شود (Poluektov and Topaj, 2001). هنگامی که از رگرسیون چندمتغیره به منظور مدل‌سازی جذب فلزات سنگین توسط ذرات خاک و گیاه استفاده می‌شود، لازم است در ابتدا روابط بین صفات اصلی خاک یا گیاه و ویژگی‌های جذبی فلزات سنگین بیان شود. اما در شبکه‌های عصبی مصنوعی نیاز به این فرمول‌بندی مقدماتی نیست (Koekkoek and Booltink, 1999).

در مقابل، شبکهٔ آموزش می‌بیند تا با تغییر در مقدار ماتریس وزن‌ها طی روندی تکراری و متوالی، روابط بین ورودی‌ها و خروجی‌های مدل را بیابد. علاوه‌بر این، شبکه‌های عصبی مصنوعی این مزیت را دارند که محدودیتی از نظر تعداد بردارهای ورودی و خروجی ندارند. به هر حال شبکه‌های عصبی مصنوعی بی‌ایراد هم نیست. برای مثال، تغییر مقدار اولیهٔ وزن‌ها به تغییر خروجی‌های نهایی شبکه می‌انجامد، هر چند می‌توان این مشکل را با وزن‌دهی مجدد و تغییر مقدار بایاس رفع کرد (Persson *et al*., 2002). شبکه‌های عصبی مصنوعی در تحقیقات مرتبط با علوم خاک به طور گسترده‌ای استفاده شده است (Buszewski and Kowalkowski, 2006; Schaap *et al*., 1998; Mc Bratney *et al*., 2003; Minasny *et al*., 2004).

به‌طور کلی مدل‌های مورد استفاده در بررسی و پیش‌بینی شاخص‌ها و ویژگی‌های مختلف گیاهان زراعی را می‌توان به دو گروه مدل‌های مکانیکی و تجربی تقسیم کرد (Whisler *et al*., 1986). در مدل‌های مکانیکی برای نمایش فرایندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی از توابع ریاضی استفاده می‌شود (Whisler *et al*., 1986). هر چند مدل‌های ریاضی برای بررسی و نمایش مقادیر خارج از محدوده و دامنهٔ تغییرات داده‌های اولیه مناسب است، اما این مدل‌ها تمایل به پیچیده‌شدن و نیاز به پارامترهای ورودی زیادی دارد (Wang Bolte, 1997; Basso *et al*., 2001; *et al*., 2002). مدل‌های تجربی مبتنی بر همبستگی بین متغیرهاست. این مدل‌ها ساده‌اند و به متغیرهای ورودی کمتری نیاز دارند، هر چند در برآورد مقادیر خارج از دامنهٔ تغییرات داده‌های اولیه کارایی مناسبی ندارند. شبکه‌های عصبی مصنوعی جزء مناسب‌ترین مدل‌های تجربی است و نسبت به مدل‌های ریاضی بسیار ساده‌تر است. این شبکه‌ها روابط بین متغیرهای ورودی و خروجی را می‌یابد تا رابطه‌ای را به منظور پیش‌بینی مقادیر خروجی بر اساس مقادیر ورودی توسعه دهد (Pachepsky *et al*., 1996). از جمله کاربردهای شبکه‌های عصبی مصنوعی در علوم زراعی می‌توان به مدل‌سازی رشد و توسعهٔ گیاه، ارزیابی مقدار هدر روی عناصر غذایی و سرنوشت آفت‌کش‌ها، برآورد مقدار آب قابل استفادهٔ گیاه و پیش‌بینی بیماری‌های گیاهی اشاره کرد (Yang *et* Elizondo *et al*., 1994; Batchelor, 1997; *al*., 1997).

گندم (*Triticum aestivum* L.) در مقیاس جهانی یکی از مهم‌ترین منابع تأمین‌کنندهٔ غذای افراد است (Altenbach, 2012)، بنابراین توجه به تمامی مسائل مرتبط با این محصول راهبردی اهمیت دارد. هدف از این تحقیق بررسی امکان استفاده از مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی به منزلهٔ ابزاری جایگزین و مکمل روش‌های آزمایشگاهی در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX و POX در شاخسارهٔ گندم نان ایرانی تحت سمیت کادمیم در شرایط گلخانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

مرحلهٔ کشت گلخانه ای

برای انجام این تحقیق، آزمایشی فاکتوریل بر پایهٔ طرحی کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانهٔ تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل

1. Artificial Neural Network
2. Multilayers Perceptron
3. Transfer Function

چهار سطح کادمیم صفر Cd_0 (شاهد)، ۲۵ (Cd_{25})، ۵۰ (Cd_{50}) و ۱۰۰ (Cd_{100}) میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک بود. تیمارهای کادمیم از طریق اسپری‌کردن محلول نمک نیترات کادمیم ($Cd(NO_3)_2\ 2H_2O$) به خاک گلدان‌ها اعمال شد. تمام گلدان‌ها قبل از کشت بذر، به مدت شش ماه برای ایجاد تعادل در خاک در شرایط انکوبه نگه‌داری شد. فرایند جذب سطحی عناصر مختلف، از جمله کادمیم روی سطوح کلوییدهای خاک فرایندی پویا ولی تدریجی و برگشت‌پذیر است، با این هدف که مقدار جذب کادمیم روی کلوییدهای خاک وضعیت کم و بیش ثابتی داشته باشد. از طرف دیگر، برای آنکه شرایط خاک به حالت طبیعی آن در مزرعه شباهت بیشتری داشته باشد، لازم است خاک برای مدت طولانی انکوبه شود. در این تحقیق بذر رقم الوند از مؤسسهٔ تحقیقات بذر و نهال کرج تهیه شد. برای ضدعفونی‌کردن بذرها، ابتدا بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد غوطه‌ور شد. سپس، برای ۱۵ ثانیه در محلول آب اکسیژنه قرارگرفت و در نهایت، با آب مقطر شسته شد. قبل از کشت، خاک زراعی از مزرعهٔ پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شد (Emami, 1997) (جدول ۱).

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

خصوصیت	مقدار	خصوصیت	مقدار
کلاس بافت خاک	لومی رسی	فسفر قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۷/۰۰
اسیدیتهٔ خاک	۸/۱۰	مس قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۴/۳۸
هدایت الکتریکی (dSm^{-1})	۱/۵۵	آهن قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۵/۶۶
ظرفیت تبادل کاتیونی ($cmol_c kg^{-1}$)	۱۲/۲	منگنز قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۳/۳۳
کربنات کلسیم معادل (درصد)	۸/۰۰	روی قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۲/۶۹
نیتروژن کل (درصد)	۰/۰۹	کادمیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۷۵
پتاسیم قابل جذب (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۷۳/۰۰		

واحدهای آزمایش شامل گلدان‌های ۵ کیلوگرمی بود. تعداد پانزده بذر در هر گلدان کشت شد که پس از ده روز به تعداد ده گیاهچه در هر گلدان کاهش یافت. شرایط دمایی گلخانه بین ۲۵ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد حفظ شد. آبیاری گلدان‌ها به مدت سی روز با آب مقطر به روش وزنی صورت گرفت. پس از طی این مدت و کم‌وبیش هم‌زمان با مرحلهٔ به ساقه رفتن گندم اقدام به برداشت شاخساره شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای انتخاب نمونهٔ مناسب به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌ها، از بین ده گیاه هر واحد آزمایشی، یک گیاه انتخاب شد که وضعیتی مشابه از لحاظ مقدار و وضعیت رشد آن در اکثر گلدان‌ها داشت. سپس، برگ دوم و سوم از بالا که رشد رویشی کافی داشت، برداشت و بلافاصله در نیتروژن مایع به منظور توقف فعالیت آنزیم در لحظهٔ نمونه‌برداری منجمد شد. نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد. عصاره‌گیری پروتئین نمونه‌ها به روش چو و سئو انجام گرفت (Cho and Seo, 2005). برای این منظور، ۰/۵ گرم از نمونه‌های منجمدشده در هاون ریخته شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (بافر استخراج) ۱۰۰ میلی‌مولار (با pH ۷/۸) محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVPP) ۱ درصد اضافه شد. در ادامه با استفاده از نیتروژن مایع محتویات هاون ساییده شد تا یک مخلوط همگن تهیه شود. محتویات هاون به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شد و با استفاده از سانتریفیوژ برای مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ صورت گرفت. استخراج همهٔ نمونه‌ها در مدت کوتاهی با استفاده از بافر تازه انجام گرفت. پس از سانتریفیوژکردن نمونه‌ها، مایع رویی[1] داخل فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتر در پنج تیوب اپندورف ۱/۵ سی‌سی تقسیم و بلافاصله به تانکر نیتروژن مایع منتقل شد. عصارهٔ به دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX و POX به کار رفت. محتوی پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976). فعالیت آنزیم SOD طبق روش دیندسا و همکاران تعیین شد (Dhindsa *et al*., 1980). مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های CAT و POX از دستگاه الایزا ریدر[2] استفاده شد. برای این منظور روش چاک‌ماک و همکاران به کار رفت (Cakmak *et al*., 1993). در سنجش فعالیت آنزیم

1. Supernatant
2. Coastar UV-Plate

CAT با افزودن H_2O_2، مقدار آن بر اثر تجزیه‌شدن به واسطهٔ فعالیت آنزیم CAT شروع به کاهش کرد و مقدار کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه ثبت شد. در سنجش فعالیت آنزیم POX اکسایش گویاگول در طول موج ۴۹۰ نانومتر و تغییرات مقدار جذب ثبت شد. برای سنجش فعالیت آنزیم APX روش آسادا به کار رفت (Asada, 1984)، برای این منظور، کاهش جذب مخلوط واکنش و سرعت کاهش H_2O_2 در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد.

اندازه‌گیری غلظت عناصر، وزن تر و خشک شاخساره و مقدار کلروفیل

شاخساره گندم برداشت و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد. نمونه‌های خشک‌شده آسیاب شد و بعد از خاکسترگیری نمونه‌های آسیاب‌شده در کورهٔ الکتریکی با درجهٔ حرارت ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، نمونه‌های خاکسترشده در اسید کلریدریک ۲ مولار حل و عصارهٔ به دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس، میانگین غلظت عناصر کادمیم، مس، آهن، روی، منگنز و پتاسیم در شاخسارهٔ رقم الوند (Emami, 1997) اندازه‌گیری شد. وزن تر و خشک شاخساره (ترازوی ۰/۰۰۱ گرم) و کلروفیل‌های a و b (Arnon, 1949) نیز اندازه‌گیری شد.

مرحلهٔ مدل‌سازی

مدل رگرسیون چندمتغیره

به منظور طراحی مدل رگرسیون چندمتغیره، در گام اول ضرایب همبستگی بین پارامترهای ده‌گانه (شامل غلظت عناصر کادمیم، مس، آهن، روی، منگنز، پتاسیم در شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره و کلروفیل‌های a و b) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل SOD، CAT، APX و POX تعیین شد (جدول ۲).

جدول ۲. ضرایب همبستگی بین پارامترهای ده‌گانه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

	SOD		CAT		APX		POX	
	CC[a]	Sig[b]	CC	Sig	CC	Sig	CC	Sig
کادمیم	۰/۷۹	۰/۰۰۲	-۰/۹۷	۰/۰۰۰	-۰/۹۷	۰/۰۰۰	-۰/۸۶	۰/۰۰۰
مس	-۰/۸۲	۰/۰۰۱	۰/۹۲	۰/۰۰۰	۰/۸۶	۰/۰۰۰	۰/۹۰	۰/۰۰۰
آهن	-۰/۷۹	۰/۰۰۲	۰/۷۹	۰/۰۰۲	۰/۷۵	۰/۰۰۵	۰/۸۳	۰/۰۰۱
روی	-۰/۷۱	۰/۰۱۰	۰/۹۰	۰/۰۰۰	۰/۹۱	۰/۰۰۰	۰/۸۹	۰/۰۰۰
منگنز	-۰/۸۰	۰/۰۰۱	۰/۹۶	۰/۰۰۰	۰/۹۲	۰/۰۰۰	۰/۹۱	۰/۰۰۰
پتاسیم	-۰/۸۵	۰/۰۰۰	۰/۹۴	۰/۰۰۰	۰/۸۹	۰/۰۰۰	۰/۹۲	۰/۰۰۰
وزن تر	-۰/۷۱	۰/۰۰۹	۰/۶۱	۰/۰۳۳	۰/۵۵	۰/۰۶۴	۰/۵۹	۰/۰۴۴
وزن خشک	-۰/۶۹	۰/۰۱۵	۰/۵۰	۰/۱۰۰	۰/۳۶	۰/۲۴۷	۰/۵۲	۰/۰۸۱
کلروفیل a	-۰/۶۱	۰/۰۳۴	۰/۸۸	۰/۰۰۰	۰/۹۶	۰/۰۰۰	۰/۸۶	۰/۰۰۰
کلروفیل b	-۰/۶۲	۰/۰۳۰	۰/۸۹	۰/۰۰۰	۰/۹۶	۰/۰۰۰	۰/۸۷	۰/۰۰۰

a: ضریب همبستگی b: سطح احتمال معناداری ضریب همبستگی

سپس، با توجه به ضرایب همبستگی، از بین پارامترهای ده‌گانه سه پارامتر که بیشترین همبستگی را با هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشت انتخاب شد. این سه پارامتر ورودی‌های مدل رگرسیون چندمتغیره برای هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته شد. این نکته شایان ذکر است که پارامترهای سه‌گانهٔ انتخاب‌شده در مورد همهٔ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد بررسی در این تحقیق به طور کامل مشابه نبود. به این ترتیب، برای آنزیم SOD و POX پارامترهای مس، منگنز و پتاسیم، برای آنزیم CAT پارامترهای کادمیم، منگنز و پتاسیم و برای آنزیم APX پارامترهای کادمیم، کلروفیل a و b پارامترهای ورودی معادلات رگرسیون چندمتغیره انتخاب شد.

در ادامه معادلات رگرسیونی هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با توجه به پارامترهای سه‌گانهٔ مطلوب برای آن آنزیم و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تعیین شد (روابط ۱ تا ۴).

(رابطهٔ ۱)

$$SOD = ۰/۰۹ \times Cu - ۰/۱۸ \times Mn - ۲/۲۸ \times K + ۳۱/۶۵$$

(رابطهٔ ۲)

$$CAT = -۰/۶۹ \times Cd + ۰/۴۸ \times Mn + ۲/۹۲ \times K + ۷۵/۷۱$$

(رابطهٔ ۳)

$$APX = -۹/۴۷ \times Cd + ۱۶۸/۶۸ \times Chla - ۱۰/۵۴ \times Chlb + ۱۰۰/۲۲$$

(رابطهٔ ۴)

$$POX = ۵۱/۴۸ \times Cu + ۳۸/۱۱ \times Mn + ۴۹۴/۸۹ \times K - ۱۹۸۶/۷۶$$

در جدول ۳ ضرایب همبستگی و سطح احتمال معناداری روابط آمده است.

جدول ۳. ضرایب همبستگی و سطح احتمال معناداری روابط

	R	RS	ARS	Sig
SOD	۰/۸۷	۰/۷۶	۰/۶۷	۰/۰۰۷
CAT	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۰۰۰
APX	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۰۰۰
POX	۰/۹۴	۰/۸۹	۰/۸۵	۰/۰۰۰

R: ضریب همبستگی چندگانه RS: ضریب تعیین چندگانه
ARS: ضریب تعیین چندگانهٔ تعدیل‌یافته Sig: سطح احتمال معناداری روابط

سپس، با استفاده از معادلات رگرسیونی به دست آمده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شاخسارهٔ گندم نان رقم الوند پیش‌بینی شد. در نهایت، نتایج به دست آمده از معادلات رگرسیونی با نتایج حاصل از شبکهٔ عصبی مصنوعی مقایسه شد.

مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی

مدل شبکه عصبی مصنوعی از لحاظ تعداد بردارهای ورودی و خروجی محدودیتی ندارد، اما برای مقایسهٔ نتایج مدل رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی، ورودی‌های هر یک از معادلات رگرسیون چندمتغیره برای هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ورودی‌های مدل شبکهٔ عصبی نظیر برای آن آنزیم به‌خصوص هم در نظر گرفته شد. یکی از مهم‌ترین مراحل طراحی و توسعهٔ مدل شبکهٔ عصبی، آموزش ماتریس وزن‌هاست. برای این منظور در این تحقیق از نرم‌افزار MATLAB استفاده شد. این نرم‌افزار دارای الگوریتم‌های متنوع آموزش شبکه است. به منظور ارزیابی کارایی مدل طراحی‌شده از شاخص میانگین مربعات خطا استفاده شد. میانگین مربعات خطا شاخصی دقیق و قابل اطمینان جهت واسنجی و آزمودن مدل شبکهٔ عصبی است و به صورت رابطهٔ (۵) تعریف می‌شود (Keshavarzi and Sarmadian, 2010).

$$MSE = \frac{1}{n}\sum_{k=1}^{n}\left(Z_o - Z_p\right)^2 \qquad \text{(رابطهٔ ۵)}$$

در این معادله Z_o مقدار اندازه‌گیری‌شده، Z_p مقدار پیش‌بینی‌شده و n تعداد نمونه‌های آموزشی است. در این تحقیق از الگوریتم لونبرگ- مارکوئت[1] (LM) به‌عنوان الگوریتم آموزشی استفاده شد. الگوریتم LM در راستای آموزش شبکه‌های عصبی مصنوعی بسیار مناسب است، زیرا یکی از بهترین شاخص‌های بررسی کارایی در شبکه‌های عصبی، خطای میانگین مربعات (MSE) است. توابع انتقالی لایه‌های مخفی و خروجی به ترتیب تانژانت سیگموید[2] و پیورلاین[3] انتخاب شد. برای تعیین بهترین معماری شبکهٔ عصبی، نورون‌های شبکه به تدریج تا ده نورون در لایهٔ مخفی افزایش یافت و به ازای افزودن هر نورون، شبکهٔ طراحی‌شده تا پنج مرتبه اجرا شد. در ادامه میانگین MSE حاصل از پنج تکرار هر یک از مدل‌ها محاسبه شد. کمترین مقدار میانگین MSE بهترین معماری شبکهٔ عصبی مصنوعی انتخاب شد (جدول ۴).

جدول ۴. مقادیر مجموع مربعات خطا (MSE) برای تعداد مختلف نورون در لایهٔ مخفی شبکهٔ عصبی مصنوعی

تعداد نورون	SOD	CAT	APX	POX
۱	۴/۸۱	۴/۴۳	۳۱۹/۵۳	۱۲۲۷۵۵
۲	۵/۶	۸/۲۴	۱۹۹/۷۵	۱۰۰۵۲۶/۴
۳	۱۷/۴۲	۳/۰۲	۳۷۷/۸۱	۸۹۴۰۲/۴
۴	۱۲/۹۶	۱/۰۸	۴۹۶/۸۶	۱۱۱۵۹۸/۸
۵	۱/۲۶	۱۳/۸۶	۱۱۹/۴۸	۴۵۶۸/۲
۶	۱/۳۱	۲/۷۱	۵۴/۲۸	۳۹۵۵۷۶/۴
۷	۴/۷۵	۲/۲۲	۶۷۷/۹۳	۲۷۱۸۶/۶
۸	۵/۷۲	۴/۹۳	۶۲/۰۷	۶۸۵۵۵/۲
۹	۲/۱۹	۲/۹۶	۱۱۹/۰۶	۵۰۳۰۳۸/۶
۱۰	۳/۷۸	۹/۶۶	۱۹۱/۲۴	۲۸۲۲۷۴/۸

پس از آموزش شبکه و به منظور بررسی کارایی مدل انتخاب‌شده، اقدام به شبیه‌سازی مدل شبکهٔ عصبی شد؛ به این صورت که از مجموعه‌ای از داده‌های آزمایشی که در مرحلهٔ آموزش شبکه به کار برده نشده بود، به‌عنوان مجموعهٔ داده‌های آزمایشی برای بهترین مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی استفاده شد. در مرحلهٔ شبیه‌سازی، مدل شبکهٔ عصبی داده‌های خروجی را با توجه به مقادیر داده‌های ورودی ایجاد می‌کند. در نهایت، نتایج حاصل از مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی با نتایج مدل رگرسیون چندمتغیره مقایسه شد.

نتایج و بحث

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

از بین پارامترهای ده‌گانهٔ اولیه، سه پارامتر میانگین غلظت مس، منگنز و پتاسیم در شاخسارهٔ رقم الوند بیشترین همبستگی را با مقدار فعالیت آنزیم SOD نشان داد (جدول ۲). همبستگی منفی بین غلظت عناصر مس و منگنز و مقدار فعالیت آنزیم SOD نشان‌دهندهٔ این مطلب است که به دلیل اثر رقابتی بین

1. Levenberg-Marquardt

2. Tangent Sigmoid
3. Purelin

این عناصر و کادمیم برای عبور از غشای سلولی در پروتئین‌های ناقل (De Maria *et al*., 2011)، همچنین رقابت برای اشغال جایگاه کوفاکتور در ساختار ایزوآنزیم‌های SOD (Mhamdi *et al*., 2010)، با افزایش مقدار کادمیم در محیط رشد ریشه، جذب مس و منگنز کاهش و به دنبال تنش اکسایشی ناشی از جذب مقادیر بیش از حد کادمیم، فعالیت آنزیم SOD افزایش می‌یابد. همچنین، همبستگی منفی بین غلظت پتاسیم و مقدار فعالیت آنزیم SOD را می‌توان مربوط به رقابت بین پتاسیم و کادمیم برای جذب در ریشه‌های گیاه و اشغال جایگاه‌های دارای بار منفی در سطوح رس دانست. مدل بهینهٔ شبکهٔ عصبی مصنوعی جهت پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم SOD به طوری که کمترین مقدار MSE را داشته باشد، زمانی به دست آمد که لایهٔ مخفی دارای پنج نورون بود (جدول ۴). با مقایسهٔ نتایج حاصل از مدل‌های بهینهٔ رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی مشخص شد که کارایی مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی (r^2=0.87) در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم SOD بیش از مدل رگرسیون چندمتغیره (r^2=0.76) بود (جدول ۵).

جدول ۵. مقایسهٔ مقادیر پیش‌بینی‌شده و اندازه‌گیری‌شده فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT (U mg^{-1} Protein)

	مدل بهینه‌شده رگرسیون چندمتغیره		مدل بهینه‌شدهٔ شبکهٔ عصبی مصنوعی	
	پیش‌بینی‌شده (p)	اندازه‌گیری‌شده (m)	پیش‌بینی‌شده (p)	اندازه‌گیری‌شده (m)
سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	۹	۶	۸/۱۶	۶
	۷/۳۵	۶/۱	۷/۴	۶/۱
	۸/۳۳	۵/۷	۷/۲۸	۵/۷
	۱۳/۸۹	۱۴	۱۴/۳	۱۴
	۱۱/۱۹	۱۴/۲	۱۵/۶۵	۱۴/۲
	۱۲/۵۵	۱۴/۴	۹/۹۲	۱۴/۴
	۱۷/۷۶	۲۰	۱۹/۳۱	۲۰
	۱۷/۹۱	۲۰/۴	۲۰/۳۹	۲۰/۴
	۱۶/۶۴	۱۹/۹	۱۹/۸۹	۱۹/۹
	۲۱/۱۱	۱۶/۸	۱۵/۹۲	۱۶/۸
	۱۹/۴۸	۱۶/۹	۲۰/۴۵	۱۶/۹
	۱۸/۷۷	۱۷/۱	۱۷/۰۶	۱۷/۱
	$m = 1.0098 \times p - 0.3487$		$m = 0.8795 \times p + 2.0741$	
	r^2= 0.76	Sig=0.007	r^2=0.87	Sig=0.004
کاتالاز (CAT)	۱۲۰/۴۶	۱۲۵	۱۲۱/۹۱	۱۲۵
	۱۲۳/۸۷	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳
	۱۲۵/۰۱	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	۱۱۱/۳۹	۱۱۲	۱۱۲/۰۳	۱۱۲
	۱۱۴/۷۴	۱۱۲/۴	۱۱۵/۱۸	۱۱۲/۴
	۱۱۳/۴۴	۱۱۲/۹	۱۱۲/۹	۱۱۲/۹
	۹۳/۴۷	۹۴	۹۴	۹۴
	۹۴/۹۴	۹۴/۲	۹۴/۲	۹۴/۲
	۹۶/۶۷	۹۳/۹	۸۷/۱۳	۹۳/۹
	۸۶/۹۵	۸۸	۸۶/۱۶	۸۸
	۸۶/۶۴	۸۸/۶	۸۸/۱۶	۸۸/۶
	۸۷/۸۳	۸۷/۹	۸۸/۱۷	۸۷/۹
	$m = 0.9996 \times p + 0.1657$		$m = 1.0128 \times p - 1.9262$	
	r^2= 0.97	Sig=0.000	r^2= 0.98	Sig=0.000

آنزیم کاتالاز (CAT)

در این تحقیق بین کادمیم و فعالیت آنزیم CAT همبستگی منفی مشاهده شد (جدول ۲). علت کاهش فعالیت آنزیم CAT با افزایش مقدار کادمیم، برهم‌کنش پروتئین‌های دخیل در ساختار آن با ROS، کاهش تولید آنزیم CAT و تغییر ساختار پیش‌واحدهای پروتئینی مورد نیاز آن است (Feieraband and Engel, 1986; Hertwig *et al*., 1992; MacRae and Ferguson, 1985). وجود همبستگی مثبت بین غلظت منگنز و پتاسیم در شاخساره و مقدار فعالیت این آنزیم را می‌توان مربوط به اثر رقابتی بین این عناصر و کادمیم دانست؛ به این صورت که با افزایش سطح کادمیم خاک، مقدار جذب منگنز و پتاسیم کاهش و در سطوح بالای کادمیم به دنبال تخریب ساختار آنزیم CAT (Hertwig *et al*., 1992; Feieraband and Engel, 1986; MacRae and Ferguson, 1985) مقدار فعالیت این آنزیم نیز کاهش می‌یابد. بهترین مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی مربوط به مدلی با چهار نورون در لایهٔ مخفی بود (جدول ۴). نتایج حاصل از مدل‌های بهینهٔ رگرسیون چندمتغیره (r^2=0.97) و شبکهٔ عصبی مصنوعی (r^2=0.98) در جدول ۵ نشان داده شده است. کارایی این مدل‌ها در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم CAT مشابه بود.

آنزیم پراکسیداز (POX)

سه پارامتر غلظت مس، منگنز و پتاسیم در شاخسارهٔ گندم رقم الوند پارامترهایی بود که بیشترین همبستگی را با مقدار فعالیت آنزیم POX نشان داد (جدول ۲). بین این سه پارامتر و مقدار فعالیت آنزیم POX همبستگی مثبت مشاهده شد. علت این مشاهده را می‌توان مربوط به تقلیل آثار مخرب کادمیم به دلیل رقابت این عنصر با عناصر مس، منگنز و پتاسیم دانست (Gonçalves *et al*., 2009; Sharma *et al*., 2008). به عبارت دیگر، با بهبود وضعیت تغذیه‌ای مس، منگنز و پتاسیم کارایی آنزیم POX نیز بهبود می‌یابد. بهترین معماری مدل شبکهٔ عصبی برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم POX مربوط به مدلی با پنج نورون در لایهٔ مخفی بود (جدول ۴). با توجه به نتایج جدول ۶ می‌توان گفت که کارایی مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی به طور محسوسی (r^2=0.98) بیش از مدل رگرسیون چندمتغیره (r^2=0.96) بود.

جدول ۶. مقایسهٔ مقادیر پیش‌بینی‌شده و اندازه‌گیری‌شدهٔ فعالیت آنزیم‌های APX و POX (U mg^{-1} Protein)

	مدل بهینه‌شدهٔ رگرسیون چندمتغیره		مدل بهینه‌شدهٔ شبکهٔ عصبی مصنوعی	
	پیش‌بینی‌شده (p)	اندازه‌گیری‌شده (m)	پیش‌بینی‌شده (p)	اندازه‌گیری‌شده (m)
آسکوربات پراکسیداز (APX)	۴۶۱/۷۸	۴۷۴	۴۷۸/۹۱	۴۷۴
	۴۴۹/۹۴	۴۶۳	۴۵۷/۴۱	۴۶۳
	۴۵۵/۶۳	۴۷۵	۴۷۶/۰۷	۴۷۵
	۴۰۷/۶۸	۳۸۸	۴۰۷/۹۵	۳۸۸
	۴۱۱/۶۸	۳۸۶	۳۸۱/۸۷	۳۸۶
	۳۷۹/۶۳	۳۹۱	۳۷۹/۳۰	۳۹۱
	۲۱۵/۱۳	۲۲۹	۲۲۰/۴۸	۲۲۹
	۲۴۳/۱۸	۲۳۰	۲۲۸/۱۰	۲۳۰
	۲۴۹/۰۱	۲۲۸	۲۳۱/۴۹	۲۲۸
	۱۳۷/۳۴	۱۱۲	۱۱۴/۲۴	۱۱۲
	۶۳	۱۱۳	۱۰۴/۳۲	۱۱۳
	۲۶/۶۶	۱۱	۱۲۴/۶۹	۱۱
	Sig=0.000	$m = 1.0002 \times p - 0.1166$ r^2= 0.97	Sig=0.000	$m = 0.9981 \times p + 0.9574$ r^2= 0.99
پراکسیداز (POX)	۳۹۹۳/۰۴	۴۷۰۰	۳۹۹۳/۰۴	۴۷۰۰
	۴۴۵۷/۵۸	۴۵۰۵	۴۴۵۷/۵۸	۴۵۰۵
	۴۳۳۹/۵۴	۴۶۱۰	۴۳۳۹/۵۴	۴۶۱۰
	۲۷۹۹/۹۱	۲۷۰۰	۲۷۹۹/۹۱	۲۷۰۰
	۳۳۷۷/۴۱	۲۶۵۰	۳۳۷۷/۴۱	۲۶۵۰
	۳۱۵۷/۸۸	۲۴۵۰	۳۱۵۷/۸۸	۲۴۵۰
	۱۸۸۰/۱۸	۲۱۰۰	۱۸۸۰/۱۸	۲۱۰۰
	۱۶۳۸/۱۸	۲۰۵۰	۱۶۳۸/۱۸	۲۰۵۰
	۲۰۸۹/۳۸	۲۱۵۰	۲۰۸۹/۳۸	۲۱۵۰
	۸۹۱/۹۷	۱۱۵۰	۸۹۱/۹۷	۱۱۵۰
	۱۱۹۵/۱۷	۱۱۶۰	۱۱۹۵/۱۷	۱۱۶۰
	۱۵۸۰/۴۶	۱۱۷۵	۱۵۸۰/۴۶	۱۱۷۵
	Sig=0.000	$m = p - 0.028$ r^2= 0.96	Sig=0.000	$m = 1.0586 \times p - 27.606$ r^2= 0.98

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

سه پارامتر غلظت کادمیم در شاخساره و غلظت کلروفیل‌های a و b بیشترین همبستگی را با مقدار فعالیت آنزیم APX نشان داد (جدول ۲). بین غلظت کادمیم در شاخساره و مقدار فعالیت این آنزیم همبستگی منفی مشاهده شد. آنزیم APX سبب احیای H_2O_2 حاصل از تنش اکسایشی می‌شود. اما در شرایطی که سطح کادمیم بالا باشد، به دلیل مقادیر زیاد H_2O_2، کارایی این آنزیم به شدت کاهش می‌یابد (Hsu and Kao, 2007). بین کادمیم و عناصر ریزمغذی از قبیل مس، آهن، منگنز و روی برای جذب در ریشه رقابت وجود دارد (Dudka and Piotrowska, 1996). از طرفی، جذب این عناصر به صورت جذب فعال است که نیاز به صرف انرژی دارد و این انرژی باید طی فرایند فتوسنتز تأمین شود و ثبات ساختار مولکول کلروفیل که کادمیم اثر مخربی بر آن دارد (Vassilev and Yordanov 1997) نقش کلیدی در فرایند فتوسنتز دارد. بنابراین، با حفظ ساختار کلروفیل انرژی لازم جهت جذب فعال عناصر ریزمغذی فراهم می‌شود و به دلیل اثر رقابتی بین این عناصر و کادمیم، جذب کادمیم و به دنبال آن آثار مخرب آن از قبیل تولید H_2O_2 کاهش می‌یابد که سبب کاهش سریع کارایی آنزیم می‌شود. زمانی که تعداد نورون‌های لایهٔ مخفی در مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی به شش نورون رسید، کمترین مقدار MSE مشاهده شد (جدول ۴). نتایج حاصل از مدل‌های بهینهٔ رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی به منظور پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم APX در جدول ۶ نشان داده شده است. با توجه به این جدول می‌توان گفت کارایی مدل بهینهٔ شبکهٔ عصبی (r^2=0.99) در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم APX کمی بیش از کارایی مدل بهینهٔ رگرسیون چندمتغیره (r^2=0.97) بود.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اطلاعات ارزش‌مندی را در رابطه با سلامت گیاهان زراعی در اختیار محققان قرارمی‌دهد. در شرایطی که تنش اکسایشی در کوتاه‌مدت سلامت گیاهان زراعی و به دنبال آن در درازمدت امنیت غذایی را تهدید می‌کند، آگاهی از وضعیت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان شاخص‌های زیستی که اولین واکنش‌های گیاهان زراعی را در برابر این گونه تنش‌ها منعکس می‌کند، اهمیت بالایی دارد، زیرا ثابت شده است که این آنزیم‌ها اولین خط دفاعی سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی است (Mohamdi *et al.*, 2010). بنابراین، پایش و کنترل سطح فعالیت این آنزیم‌ها منطقی‌ترین راهکار کنترل سطح تنش اکسایشی در گیاهان زراعی است، اما سنجش مداوم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مستقل از پیچیدگی‌های روش‌های آزمایشگاهی، از لحاظ هزینه و زمان به‌صرفه نیست. استفاده از مدل‌های ریاضی و تجربی از قبیل رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی روش جایگزینی برای برآورد و تخمین کلی سطح فعالیت این آنزیم‌ها مطرح است. با توجه به مقدار ضریب همبستگی (r^2) بین مقادیر اندازه‌گیری‌شده و پیش‌بینی‌شدهٔ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مشخص شد که تخمین سطح فعالیت آنزیم SOD در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بررسی‌شده در این تحقیق کمترین دقت را داشت.

از بین پارامترهای ده‌گانهٔ بررسی‌شده در این تحقیق، دو پارامتر میانگین غلظت منگنز و پتاسیم در شاخسارهٔ رقم الوند در مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی جهت پیش‌بینی سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و POX حضور داشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که تحت سمیت کادمیم و بروز تنش اکسایشی، توجه به وضعیت تغذیه‌ای این دو عنصر در طراحی مدل‌های پیش‌بینی‌کنندهٔ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش آثار مخرب کادمیم و عملکرد بهتر سیستم دفاعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گندم نان نقش برجسته‌ای داشته باشد.

در این تحقیق از هر دو مدل رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی برای پیش‌بینی سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شاخسارهٔ رقم الوند که رقم گندم نان ایرانی است، در خاک آلوده به کادمیم استفاده شد. نتایج حاصل از مدل‌های بهینه‌شدهٔ رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی نشان داد که در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های SOD و POX، کارایی مدل شبکهٔ عصبی مصنوعی بیش از مدل رگرسیون چندمتغیره بود، اما در پیش‌بینی مقدار فعالیت آنزیم‌های CAT و APX کارایی مدل‌های رگرسیون چندمتغیره و شبکهٔ عصبی مصنوعی کم‌وبیش مشابه بود. سایر محققان نتایج مشابهی را در تخمین و پیش‌بینی غلظت کلروفیل تحت تنش فلزات سنگین، مقدار جذب کادمیم توسط کربن خاک، پیش‌بینی خصوصیات خاک و تخمین مقدار ظرفیت تبادلی خاک گزارش کردند (Liu *et al.*, 2010; Hema and Sarmadian *et al.*, 2009; Krishnamoorthy 2012; Keshavarzi and Sarmadian, 2010; Amini *et al.*, 2005). به‌طور کلی و با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که با مشخص‌بودن غلظت عناصر غذایی در شاخسارهٔ گندم نان به‌خصوص غلظت منگنز و پتاسیم، می‌توان با دقت مناسبی سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تخمین زد.

REFERENCES

Amini, M. K.C. Abbaspour, H. Khademi, N. Fathianpour, M. Afyuni R. Schulin. (2005). Neural network models to predict cation exchange capacity in arid regions of Iran, *European Journal Soil Science*., Vol. 53, 748–757.

Altenbach, S.B. (2012). New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *Journal of Cereal Science* 56, 39–50.

Aravind, P. Prasad, M. N. V. (2005). Cadmium–zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum L.*: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 3–20.

Arnon DI, (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. *Plant physiology* 24: 1–15.

Asada, K. (1984). Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymology*. 105, 422-429.

Balestrasse K.B., L. Gardey, S.M. Gallego, M.L. (2001). Tomaro, Response of antioxidant defense system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress, *Australian Journal Plant Physiology*. 28: 497-504.

Basso, B. Ritchie, J.T. Pierce, F.J. Braga, R.P. and Jones, J.W. (2001). Spatial validation of crop models for precision agriculture. *Agricultural Systems* 68: 97–112.

Batchelor, W.D. Yang, X.B. Tshanz, A.T. (1997). Development of a neural network for soybean rust epidemics. *Transactions of the ASAE* 40: 247–252.

Bolte, J. (1997). Biosystem modeling techniques. *Biosystems Analysis Group*, Oregon State University. (Online) Available at http://biosys.bre.orst.edu/BRE571/intro/intro_concepts.htm (verified 29th April. 2004).

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. *Biochemistry*. 72, 248-54.

Buszewski, B. Kowalkowski, T. (2006). A new model of heavy metal transport in the soil using non-linear artificial neural networks. *Environmental Engendering Sciences*. 23 (4): 589–595.

Cakmak, I. Strboe, D. and Marschner, H. (1993). Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal Experimental Botanic* 44, 127-132.

Cherif, J. Mediouni, C. Ammar, W. B and Jemal, F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (Solanum lycopersicum). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5): 837–844.

Cho, U.H. Seo, N.H. (2005). Oxidative stress in Arabidopsis thaliana exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sciences*. 168, 113–120.

De Maria, S. Rivelli, R. A. Kuffner, M. Sessitsch, A. Wenzel, W. W. Gorfer, M. Strauss, J. Puschenreiter, M. (2011). Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere*, 84: 1256–1261.

Dhindsa, R.S. Dhinsa, P.P. Thorpe, T.A. (1980). Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal Experimental Botanic*. 32, 127-132.

Dudka, S. M and Piotrowska, H. T. (1996). Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: A field study, *Environmental Pollution* 94:181–188.

Elizondo, D.A. McClendon, R.W. and Hoogenboom, G. (1994). Neural network models for predicting flowering and physiological maturity of soybean. *Transactions of the ASAE* 37:981–988.

Emami, A (1997). Methods of plant analysis. Volume I, Soil and Water Research Institute, *Technical Bulletin* No. 982.

Feieraband J., S. Engel, (1986). Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves, *Biochemistry Biophysics*. 251: 567-576.

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.

Gonçalves J F Fabiane G Antes J Maldaner L Belmonte P Luciane A Tabaldi R Rauber L Veronica R Dilson A Bisognin V Luiz D E´ rico M Moraes F And Fernando T (2009). Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. Number 47: 814–821.

Gussarson, M. H. Asp, S. A. and Jensen, P. (1996). Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of Birth (Betula pendula) by buthionine sulphoximine (BSO). *Experimental Botany* 47: 211–215.

Hassan, M. J. Z. Zhu, B. and Mahmood Q. (2006). Influence of cadmium toxicity on rice genotypes as affected by zinc, sulfur and nitrogen fertilizers. *Caspin Journal Environmental Sciences*. 4(1): 1–8.

Hecht, N. R. (1987). Kolmogorov mapping, neural network existence theorem, 1st *IEEE ICNN*, Vol. 3, san Diego, CA.

Hema, M. Krishnamoorthy, S, (2012). Evaluation of artificial neural network and multiple regression model for Cd (II) sorption on activated carbons. *Elixir Pollution* 50, 10414–10419.

Hertwig B., P. Streb, J. Feieraband, (1992). Light

dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions, *Plant Physiology*. 100: 1547-1553.

Hsu, Y.T. Kao, C.H. (2007). Heat shock-mediated H_2O_2 accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings, *Plant Soil sciences* 300: 137–147.

Jalali, M and Khanlari, Z. V. (2008). Cadmium Availability in Calcareous Soils of Agricultural Lands in Hamadan, Western Iran. *Soil and Sediment Contamination*, 17: 256–268.

Khan N. A. Samiullah, S. Singh, R. Nazar, (2007). Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (Triticum aestivum) cultivars differing in yield potential under cadmium stress, *Journal Agronomy Crop Sciences*. 193: 435-444.

Keshavarzi A. and F. Sarmadian. (2010). Comparison of Artificial Neural Network and Multivariate Regression Methods in Prediction of Soil Cation Exchange Capacity. *International Journal of Environmental and Earth Sciences* 1:1.

Koekkoek, E.J.W. Booltink, H. (1999). Neural networks models to predict soil water retention. *European Journal Soil Sciences*. 50: 489–495.

Koji Y., M. Shiro, K. Michio, T. Mitsutaka, M. Hiroshi, (2009) Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf, *Plant Production Sciences*. 12: 319-326.

Liu, M, Xiangnan, L., Mi, L., Meihong, F., Wenxue Chi. (2010). Neural network model for estimating leaf chlorophyll concentration in rice under stress from heavy metals using four spectral indices. *Biochemistry systems engineering* 106, 223–233.

Mc Bratney, A.B. Mendoca Santos, M.L. and Minasny, B. (2003). On digital soil mapping. *Geoderma* 117: 3–52.

MacRae E.A., I.B. Ferguson, (1985). Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature, *Physiolgy Plant*. 65: 51-56.

Mhamdi, A. Queval, G. Chaouch, S. Vanderauwera, S. Van Breusegem, F. and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197–4220.

Milone M.T., C. Sgherri, H. Clijters, F. Navari-Izzo, (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentrations of cadmium, *Environmental Exp Botany*. 50: 265-273.

Minasny, B. Hopmans, J.W. Harter, T. Eching, S.O. Tuli, A. and Denton, M.A. (2004). Neural networks prediction of soil hydraulic functions for alluvial soils using multistep outflow data. *Soil Sciences Society*. Am. J. 68: 417–429.

Nagamiya K., T. Motohashi, K. Nakao, S.H. Prodhan, E. Hattori, S. Hirose, K. Ozawa, Y. Ohkawa, T. Takabe, T. Takabe, A. Komamine, (2007). Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an Escherichia coli catalase gene, katE, *Plant Biotechnology*. 1: 49-55.

Pachepsky, Ya.A. Timlin, D., and Varallyay, G. (1996). Artificial neural networks to estimate soil water retention from easily measurable data. *Soil Science Society of American Journal* 60: 727–733.

Parchami, A. Ivani, R and Mashinchi M. (2011). An application of testing fuzzy hypotheses: Soil study on the bioavailability of cadmium. *Scientia Iranica*. 18 (3): 470–478.

Persson, M. Sivakumar, B. Berndtsson, R. Jacobson, O.H. and Schjonning, P. (2002). Predicting the diaelectric constant water content relationship using artificial neural networks. *Soil Sciences Society*. Am. J. 66: 1424–1429.

Polidoros N.A., J.G. Scandalios, (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (Zea mays L.), *Physiology Plant*. 106: 112-120.

Poluektov R.A, Topaj A.G, (2001). Crop modeling: nostalgia about present or reminiscence about future. *Agronomy Journal*. 93: 653–659.

Rabunal R. J. and Dorrado, J. (2006). Artificial neural networks in real-life applications. *Published by Idea Group Publishing.*

Sarmadian, F., R. Taghizadeh Mehrjardi A. Akbarzadeh, (2009). Modeling of some soil properties using artificial neural network and multivariate regression in Gorgan province, north of Iran", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*., Vol. 3, No. 1, 323–329.

Schaap, M.G. Leij, F.J. and van Genuchten, M.T. (1998). Neural networks analysis for hierarchical prediction of soil hydraulic properties. *Soil Sciences Society American Journal.* 62:847–855.

Sharma R K M. Agrawal and S B Agrawal (2008). Interactive effects of cadmium and zinc on carrots: Growth and biomass accumulation. *Journal Plant Nutrition*. 31: 19-34.

Vassilev, A and Yordanov, I. (1997). Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium–treated plants: A review. *Plant Physiology*. 23(3-4): 114–133.

Wang, F. Fraisse, C.W. Kitchen, N.R. Sudduth, K.A. (2002). Site-specific evaluation of the CROPGROW-soybean model on Missouri clay pan soils. *Agricultural Systems* 76:985–1005.

Whisler, F.D. Acock, B. Baker, D.N. Fye, R.E. Hodges, H.F. Lambert, J.R. Lemmon, H.E. McKinion, J.M. and Reddy, V.R. (1986). Crop simulation models in agronomic systems. *Advances in Agronomy* 40: 141–208.

Xu, Q. Min, H. Cai, S. Fu, Y. Sha, S. Xie, K and Du, K. (2012). Subcellular distribution and toxicity of cadmium in Potamogeton crispus L. *Chemosphere*, 89: 114–120.

Yang, C. Prasher, S.O. Sreekanth, S. Patni, N.K. and Masse, L. (1997). An artificial neural network model for simulating pesticide concentrations in soil. *Transactions of the ASAE* 40, 1285–1294.