Archive of SID

فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۶، شماره ۳، صفحه ۴۸۹-۴۷۷، (۱۳۹۹)

تأثیر قارچ میکوریز و ریزوباکتری محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نهال استبرق تحت تنش خشکی

احسان قنبری[۱]، امید فتحی‌زاده*[۲] و مسعود طبری کوچکسرائی[۳]

۱- دکترای جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. (ehsan.ghanbary29@yahoo.com)
۲- استادیار، گروه جنگلداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، اهر، ایران. (omid.fathizadeh@yahoo.com)
۳- استاد، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. (mtabari@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۵

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات و پراکسیداز در نهال استبرق (*Calotropis procera* Ait) تلقیح یافته با میکروارگانیسم‌های میکوریزی و ریزوباکتریایی تحت تأثیر تنش خشکی در یک شرایط گلخانه‌ای طی یک دوره شش‌ماهه انجام شد. آزمایش در سه سطح تلقیحی (شاهد یا عدم تلقیح، قارچ میکوریز *ریزوفاگوس ایرگولاریس* و ریزوباکتریایی *سودوموناس پوتیدا*) و با سه سطح تنش خشکی دوره‌ای (سه، شش و ۱۲ روز آبیاری) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که تلقیح میکوریز و ریزوباکتریایی *سودوموناس* تحت شرایط خشکی به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۱/۵۷ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم وزن تر)، سوپراکسید دیسموتاز (۱۷/۴۳ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم وزن تر) و آسکوربات پراکسیداز (٤/٥٦ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم وزن تر) در نهال‌های میکوریزی تحت تنش خشکی ۱۲ روز و همچنین بیشترین مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در نهال میکوریزی (۱۱/۹٦ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم وزن تر) و ریزوباکتریایی (۱۲/۹ واحد آنزیمی بر میلی-گرم وزن تر) در شرایط خشکی ۱۲ روز مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، سودوموناس، ریزوفاگوس ایرگولاریس، گونه‌های اکسیژن فعال.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۸٤٦٥٦۲۸۸

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عامل‌های غیرزیستی در تهدید رشد و نمو گیاهان در بسیاری از مناطق کشور به‌شمار می‌رود. خشکی به‌طورکلی همه جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و به‌طور قابل‌توجهی رشد گیاهان را کاهش می‌دهد (Dehghan *et al*., Pitman and Lauchli, 2002، 2016). درک پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان به تنش خشکی برای آگاهی جامع از مکانیسم مقاومت به شرایط کمبود آب ضروری است. اگرچه پاسخ‌های گونه‌های گیاهی مختلف به تنش خشکی به خوبی شناخته شده است، اما پاسخ‌های فیزیولوژیکی آنها به تنش خشکی و در شرایط تلقیح با قارچ میکوریزی و ریزوباکتریایی هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است.

همزیستی قارچ میکوریزی آربوسکولار (*Arbuscular Mycorhizal* Fungi (AMF)) یک ارتباط دوطرفه بین ریشه گیاهان است. واضح است که قارچ میکوریزی آربوسکولار، رشد گیاه میزبان را از طریق بهبود جذب مواد معدنی به‌ویژه فسفر افزایش می‌دهد (Auge, 2001 ،Fitter, 1988). به‌علاوه، همزیستی میکوریزی آربوسکولار می‌تواند روابط آبی گیاه میزبان را تحت تأثیر قرار دهد (Auge, 2001). به طورکلی، گیاهان دارای قارچ میکوریزی آربوسکولار هدایت روزنه‌ای، نرخ تعرق، هدایت هیدرولیکی و پتانسیل آبی بالاتری را در شرایط تنش آبی دارند (Auge *et al*., 2004، Sanchen-Blanco *et al*., 2004، Zhang *et al*., 2018، Ouledali *et al*., 2018).

ریزوباکتریایی محرک رشد گیاه (Plant Growth Promotion Rhizobacteria (PGPR)) گروهی از باکتری‌ها هستند که به‌طور فعال می‌توانند روی ریشه گیاه مستقرشده و جذب مواد غذایی و رشد گیاه را افزایش دهند (Kohler *et al*., 2008). از میان آنها می‌توان به ریزوباکتریایی سودوموناس اشاره کرد که اغلب سویه‌های آن، رشد و تولید برخی از گونه‌های زراعی را افزایش داده‌اند (Kohler *et al*., 2006). ریزوباکترها با تولید فیتوهورمون‌ها (اکسین، سیتوکینین و جیبرلین) و سایدروفورها (Siderophore) (Saikia *et al*., 2006) و پپتیدهای آنتی‌باکتریایی عامل بیماری‌زا را متوقف می‌کنند. به‌طورکلی اطلاعات دقیقی در ارتباط با اثرهای ریزوباکترها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت شرایط تنش آبی وجود ندارد (Kohler *et al*., 2008).

علاوه بر سازگاری‌های مورفولوژیکی (مانند ریشه دوانی عمیق، بسته شدن روزنه‌ها برای کاهش هدر رفت آب و غیره)، گیاهان یک سری مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را برای به حداقل رساندن اثرهای منفی تنش توسعه می‌دهند (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). تنش خشکی همواره منجر به تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود که به‌دلیل تراوش بالاتر الکترون‌ها نسبت به اکسیژن در طول فرآیندهای فتوسنتز و درنتیجه افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال است. در گیاهان، متابولیسم گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species (ROS)) مانند سوپراکسید (O^{2-})، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) در وضعیت تعادل است. هنگامی‌که گیاهان عالی تحت تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، اغلب گونه‌های اکسیژن فعال را تولید می‌کنند (Munne-Bosch and Penuelas, 2003، Sairam *et al*., 2005). برای حذف ROS، گیاهان تکامل‌یافته یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان را توسعه می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (G-POD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون

www.SID.ir

Archive of SID

ردوکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، آسکوربات (ASC)، گلوتاتیون (GSH)، دهیدروآسکوربات (DHA) و گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) هستند. Porcel و همکاران (2003) و Ruiz-Lozano (2003) پی بردند که قارچ میکوریزی آربسکولار گیاه میزبان را در مقابل خسارات اکسیداتیو حمایت می‌کند که به‌دلیل افزایش آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی است. همچنین، Alguacil و همکاران (2003) تأیید کردند که تلقیح *Glomus claroideum* فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی همانند کاتالاز، گلوتاتیون، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز را در گیاه *Retama sphaerocarpa* افزایش داده است.

بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که گیاهان مقاوم به خشکی در مقایسه با گونه‌های حساس، به‌طورکلی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ساختاری را تحت شرایط خشکی افزایش می‌دهند. این قضیه در گونه-های گیاهی مانند *Pinus densata* (Gao *et al.*, 2009)، توت سفید (Guha *et al.*, 2010) و دیگر گونه‌های چوبی تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Liu *et al.*, 2012). در یک بررسی توسط Wu (2007) ریشه نارنگی (*Citrus tangerine*) تلقیح شده با قارچ میکوریزی آربوسکولار نسبت به ریشه‌های تلقیح نشده تحت تنش خشکی دارای فعالیت آسکوربات، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بیشتری بود.

در همین راستا و به‌دلیل اینکه قارچ میکوریزی آربوسکولار موجب بهبود توانایی گیاه برای استقرار و مقابله با شرایط تنشی (مانند خشکی و فقر عناصر غذایی) می‌شود، چگونگی استفاده از این قارچ به-صورت تلقیح با گیاه، در حال پژوهش و بررسی به-منظور کمک به رشد گیاه در مناطق خشک و نیمه-خشک است (Requena *et al.*, 2001). استبرق (*Calotropis procera* Ait.) از تیره استبرقیان (Asclepiadaceae) یک درختچه بیابانی چندساله بومی جنوب غرب آسیا (پاکستان، هند، افغانستان، ایران، عربستان و اردن) و آفریقا (سومالی، لیبی، مراکش، مصر، موریتانی، سنگال و جنوب الجزایر) است که در درجه اول از طریق بذر زادآوری می‌کند. این گیاه می‌تواند شرایط نامطلوب اقلیمی و خاک‌های فقیر را تحمل کند به‌طوری‌که این گونه در شرایط سخت محیطی در نواحی جنوبی ایران پراکنش یافته است. استبرق به‌دلیل خواص دارویی فراوان به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (Magalhaes *et al.*, 2010). به‌علاوه، از برگ‌های استبرق به‌منظور تعلیف دام و احشام مانند شتر در طول دوره‌های خشکی در مناطق خشک و نیمه‌خشک استفاده می-شود. در رابطه با تأثیر تلقیح میکوریزی و ریزوباکتری-ها روی گونه استبرق تحت تنش خشکی بررسی‌هایی صورت گرفته است. Bahmani و همکاران (2015) کارایی تلقیح سودوموناس پوتیدا را روی بهبود برخی صفات رویشی نهال‌های استبرق تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که این ریزوباکتر موجب کاهش اثرهای منفی تنش خشکی روی صفات رویشی شد. در پژوهشی دیگر توسط Pilevar و همکاران (2015)، تأثیر قارچ میکوریز آربسکولار بر تبادلات گازی نهال استبرق مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که قارچ میکوریز موجب بهبود نرخ تبادلات گازی مانند فتوسنتز، تعرق و کارایی مصرف آب شد. همچنین تلقیح قارچ میکوریز آربسکولار *Rhizophagus irregularis* و باکتری محرک رشد *Pseudomonas putida* بر غلظت عناصر ماکرو و میکرو و شاخص کیفی نهال‌های استبرق توسط Bahmani و همکاران (2018) مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفت و نتایج نشان داد که مایه تلقیح قارچ و باکتری سبب افزایش غلظت عناصر غذایی و شاخص کیفی نهال استبرق شد.

با توجه به اینکه اطلاعات دقیقی در ارتباط با نقش همزیستی میکوریزی و نیز ریزوباکتریایی در پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه تحت تنش خشکی استبرق وجود ندارد، در این پژوهش مکانیسم نهال‌های استبرق با اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی برگ در شرایط تلقیح با ریزوباکتر *Pseudomonus putida* *strain* 169 و قارچ میکوریزی *Rhizophagus irregularis* برای مقابله با تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، غوزه‌های رسیده و تازه استبرق را (که به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای است و با فشار به غوزه نیام باز شده و بذر به خارج شیار هدایت می‌شود) در مردادماه سال ۹۱ از رویشگاه طبیعی آن در روستای آباد شهرستان تنگستان از توابع استان بوشهر (عرض جغرافیایی ″۳۵′۱°۲۹ شمالی و طول جغرافیایی ″۳′۱۵°۵۱ شرقی و ارتفاع از سطح دریا ۵۸ متر) جمع‌آوری و به مدت یک هفته در هوای آزاد و تحت سایه گذاشته شد تا بذور خشک شوند. تعداد کافی بذور همسان و یکنواخت استبرق را انتخاب کرده و با قارچ‌کش Carboxin Tiram (دو درصد) ضدعفونی کرده و بعد با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس در انکوباتور با درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٦٥ درصد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و مقدار نور ۱۰۰۰ لوکس تا زمان جوانه‌زنی و ظهور ریشه‌چه نگهداری شدند.

به‌منظور تهیه خاک گلدان سعی شد خاکی که تا حد امکان مشابهت نزدیکی با خاک رویشگاه استبرق دارد، استفاده شود. بدین منظور خاکی با بافت سبک، شنی- لومی و با ماده آلی ناچیز تهیه شد (جدول ۱) و سپس در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار یک- ونیم مگاپاسکال دو بار به‌مدت دو ساعت با یک فاصله ٢٤ ساعته اتوکلاو شد. گلدان‌های مورد استفاده، چهار کیلویی به ابعاد ۲۰×۱۵×۱۵ سانتی‌متر بود. طبق دستورالعمل موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، برای تلقیح کردن بذور با قارچ میکوریز و ریزوباکتر، ماده چسباننده و محافظ (صمغ عربی ۲۰ درصد) ساخته‌شده توسط موسسه تحقیقات خاک و آب به بذور جوانه‌دار شده (گیاهچه) اضافه شد؛ و بر اساس نوع تیمار در مایه تلقیح میکوریز (*Rhizophagus irregularis* با جمعیت propagol/gr ۲۵۰) و ریزوباکتر (*Pseudomonus putida* starin 169 با جمعیت $۱۰^{۹}$ ×۳/٦ کلنی سلول در میلی‌لیتر) قرار داده و بلافاصله بعد از تلقیح در شرایط تاریکی مقدار ۱۰ عدد بذور جوانه‌دار شده تلقیح یافته در عمق نیم تا یک سانتی‌متری خاک بستر گلدان قرار داده شد و برای اطمینان از عملیات تلقیح در بستر کشت هر گلدان ۱۰ گرم پروپاگول قارچ میکوریز *ریزوفاگوس ایرگولاریس* و ۱۰ میلی‌لیتر کلنی سلول ریزوباکتریایی *سودوموناس پوتیدا* سویه ١٦٩ قرار داده شد (Bahmani *et al*., 2018).

بعد از گذشت یک دوره رویشی پنج‌ماهه از کشت بذرهای جوانه‌دار تلقیح یافته استبرق در شرایط گلخانه و تولید نهال، اقدام به اعمال تنش خشکی با سه سطح (دور آبیاری سه (شاهد)، شش و ۱۲ روز برحسب ظرفیت زراعی مرجع خاک (Field Capacity) (FC100%) طی یک دوره رویشی شش- ماهه (فروردین- شهریور ۹۲) بر روی نهال‌ها شد.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی (Complete Randomized Design (CRD))، با تنش خشکی در سه سطح دور آبیاری سه (شاهد)، شش و ۱۲ روز و تیمار تلقیحی با سه سطح (عدم تلقیح، تلقیح قارچ میکوریز *ریزوفاگوس ایرگولاریس* و ریزوباکتر *سودوموناس پوتیدا*) در سه تکرار انجام شد. آزمایش در گلخانه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس (شهرستان نور- مازندران) با متوسط دمایی ۲٤ درجه سانتی‌گراد و ٤۱ درصد رطوبت انجام شد.

جدول ۱ - خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده گلدان‌ها

Table 1. Physico-chemical characteristics of soil used in the pot

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک Physico-chemical characteristics							
هدایت الکتریکی (µs/m) Electrical conductivity (µs/m)	0.328	رس (درصد) Clay (%)	20	نیتروژن کل (ppm) Total nitrogen (ppm)	1.13	آهن (ppm) Iron (ppm)	0.13
pH (گل اشباع)	7.71	سیلت (درصد) Silt (%)	30	فسفر قابل‌جذب (ppm) Phosphorus (ppm)	0.2	منگنز (ppm) Manganese (ppm)	0.02
شن (درصد) Sand (%)	50	کربن آلی Organic carbon	1.33	پتاسیم (ppm) Potassiom (ppm)	9	روی (ppm) Zink (ppm)	0.08

اندازه‌گیری‌ها

برای سنجش آنزیم‌ها، ۰/۵ گرم برگ تازه در ازت مایع منجمد کرده و سپس در چهار میلی‌لیتر محلول حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.0)، ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدون و ۰/۲ میلی مولار اسید آسکوربیک سائیده شده و عصاره‌گیری شد. همگن حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای دو تا چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش Stewart and Bewley (1980) و فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Chance and Meahly (1955) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Polle و همکاران (1994) فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano and Asada (1981) اندازه‌گیری شد. همچنین درصد کلنیزاسیون ریشه با روش Grind line Intersect تعیین شد (Giovannetti and Mosse, 1980).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. داده‌های پس از آزمون نرمال بودن و همگنی واریانس با استفاده از آزمون تجزیه واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) تجزیه‌وتحلیل شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) در سطح اطمینان پنج درصد استفاده شد.

نتایج

درصد کلنیزاسیون در نهال تلقیح‌شده با میکوریز ۳۱ /۳۸ درصد و در نهال‌های تلقیح‌شده با ریزوباکتر ۸۹ درصد مشاهده شد. نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داد که اثرهای تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار و ریزوباکتریایی سودوموناس، تنش خشکی و به‌علاوه ترکیب خشکی و تلقیح روی مقدار آنزیم‌های آنتی-اکسیدان نهال استبرق معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سطوح مختلف تلقیح و تنش خشکی

Table 2. The results of two-way ANOVA analysis of antioxidant enzymes at different levels of inoculation and drought stress

منابع تغییرات Variation sources		کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
خشکی Drought	درجه آزادی Degree of freedom	2	2	2	2
	F- value	23.58	46.58	124.96	227.3
	P - value	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
تلقیح Inoculation	درجه آزادی Degree of freedom	2	2	2	2
	F- value	10.67	9.93	7.27	27.36
	P - value	0.005**	0.001**	0.001**	0.001**
خشکی × تلقیح Inoculation× Drought	درجه آزادی Degree of freedom	4	4	4	4
	F- value	3.08	2.68	3.67	5.69
	P - value	0.042*	0.048*	0.024*	0.005**

**معنی‌داری در سطح یک درصد.

*معنی‌داری در سطح پنج درصد.

**Significant at the level of 0.01.

*Significant at the level of 0.05.

کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بین نهال‌های تلقیح شده و نشده در سطح تیمار آبی شاهد و دوره آبیاری ٦ روزه تفاوت معنی‌داری نشان نداد، درحالی‌که در دوره آبیاری ۱۲ روزه بین نهال‌های تلقیح نشده و تلقیح شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بین اثرهای قارچ *ریزوفاگوس ایرگولاریس* و ریزوباکتر *سودوموناس پوتیدا* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. به‌علاوه، تحت تأثیر تنش خشکی فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش نشان داد (شکل ۱).

پراکسیداز

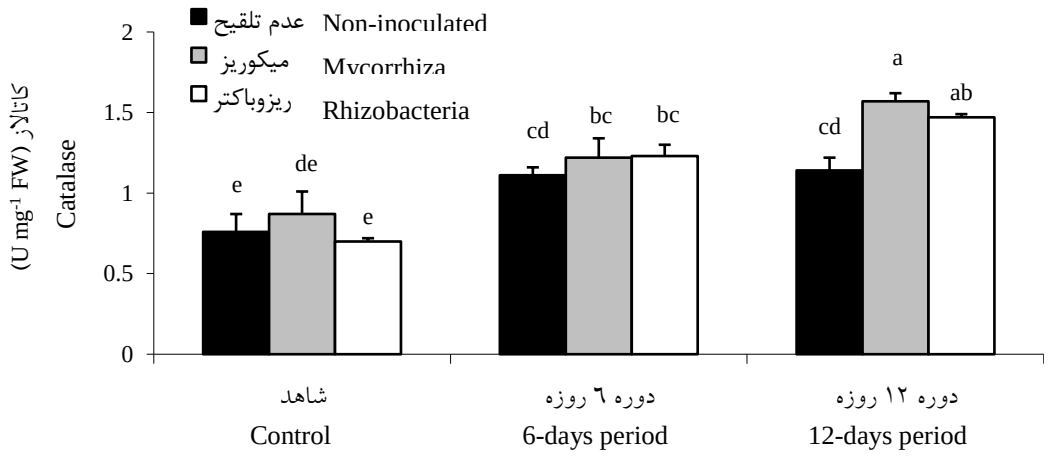
فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در شرایط ترکیب اثرهای تنش خشکی و تیمار تلقیح شدت افزایش فعالیت پراکسیداز بیشتر بود. به‌علاوه، بین اثرهای تلقیح با قارچ *ریزوفاگوس ایرگولاریس* و ریزوباکتر *سودوموناس پوتیدا* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲).

سوپراکسید دیسموتاز

تنش خشکی به‌طور معنی‌داری مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد. از طرف دیگر، فعالیت این آنزیم در تیمار تلقیح با قارچ *ریزوفاگوس ایرگولاریس* تحت دوره آبیاری ۱۲ روزه نسبت به دیگر سطوح بیشتر بود (شکل ۳).

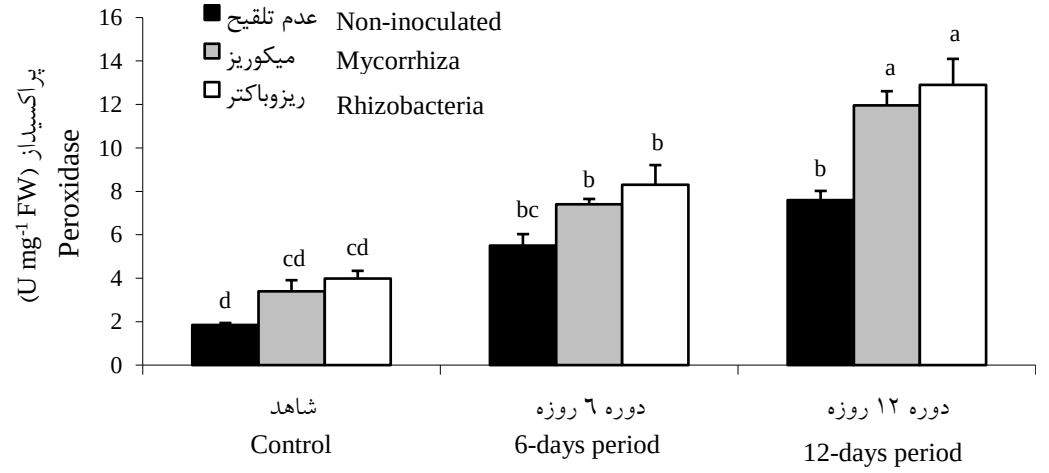
www.SID.ir

Archive of SID



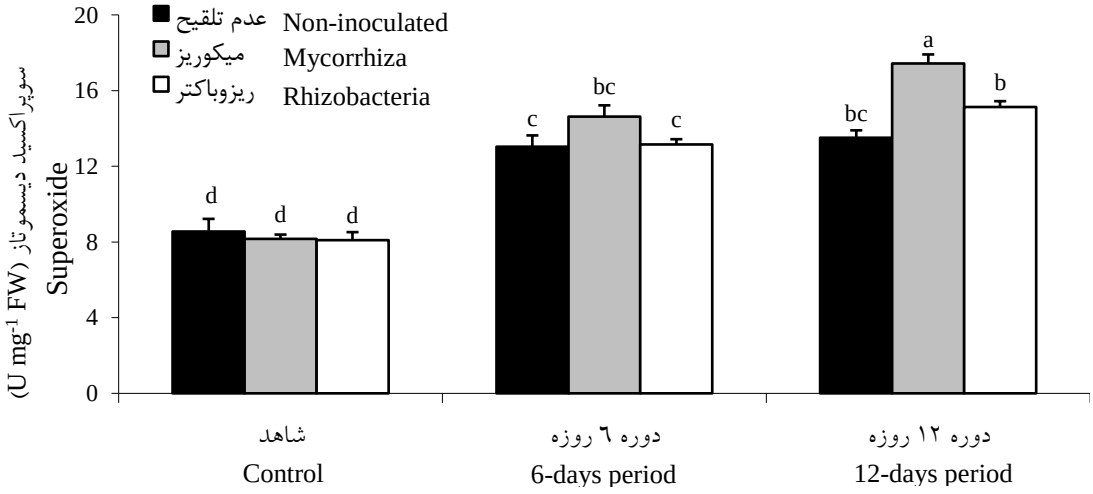
شکل ۱- فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح تلقیح میکوریزی و ریزوباکتریایی تحت تنش خشکی

Figure 2. Catalase activity in levels of inoculation of mycorrhiza and rhizobacteria under drought stress



شکل ۲- فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح تلقیح میکوریزی و ریزوباکتریایی تحت تنش خشکی

Figure 2. Peroxidase activity in levels of inoculation of mycorrhiza and rhizobacteria under drought stress



شکل ۳- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطوح تلقیح میکوریزی و ریزوباکتریایی تحت تنش خشکی

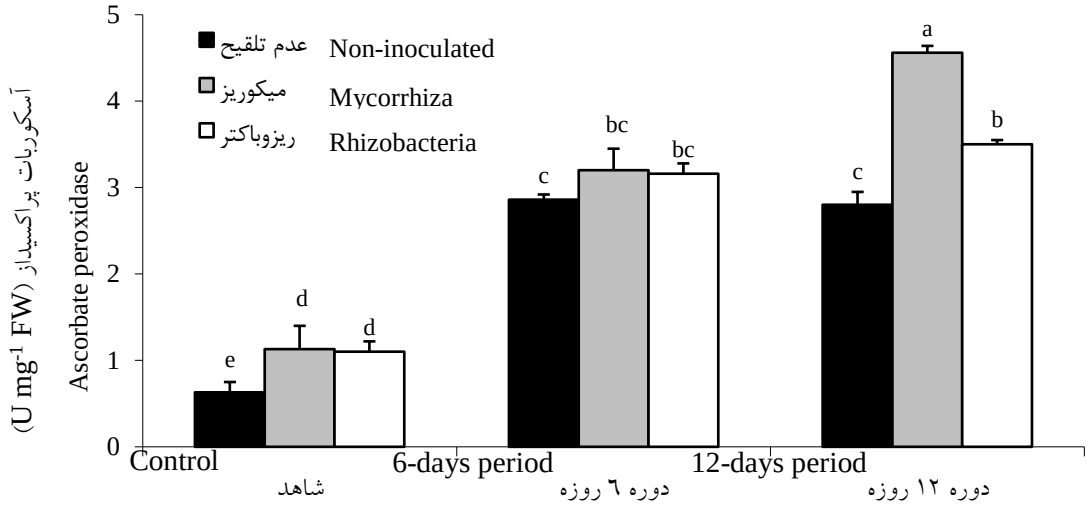
Figure 3. Superoxide dismutase activity in levels of inoculation of mycorrhiza and rhizobacteria under drought stress

www.SID.ir

Archive of SID

آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تمام سطوح تلقیحی میکوریزی و ریزوباکتریایی و تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. بیشترین مقدار فعالیت این آنزیم در تیمار تلقیح *ریزوفاگوس ایرگولاریس* در دوره آبیاری ۱۲ روزه مشاهده شد (شکل ٤).



شکل ٤- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطوح تلقیح میکوریزی و ریزوباکتریایی تحت تنش خشکی

Figure 3. Ascorbate peroxidase activity in levels of inoculation of mycorrhiza and rhizobacteria under drought stress

بحث

قارچ میکوریزی آربوسکولار در همزیستی ریشه گیاه به‌وسیله بهبود جذب مواد غذایی، تغییر روابط آبی گیاه، بهبود اثرهای سلولی و فیزیولوژیکی و تنظیمات اسمزیک موجب افزایش رشد و زنده‌مانی گیاه تحت شرایط اپتیمم و یا تنش آبی می‌شود (Ruiz-Lozano, 2003، Wu *et al*., 2007). مکانیسم‌های احتمالی برای بهبود روابط آبی گیاه در تلقیح با قارچ میکوریزی شامل جذب مستقیم آب و انتقال از طریق هیف‌های خارجی (Augé *et al*., 2003) و اثرهای غیرمستقیم مانند بهبود جذب فسفر، ظرفیت بیشتر آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و تنظیمات اسمزی است (Wu *et al*., 2007، Ruiz-Lozano, 2003).

گونه‌های فعال اکسیژن اولین پیام‌رسان‌ها در پاسخ به حمله تنش خشکی هستند (Talbi *et al*., 2015) که در پژوهش‌های گذشته غلظت آنها تحت تأثیر این تنش در گیاهان مختلف افزایش پیدا کرده است (Zhang *et al*., 2010، Jia *et al*., 2015، Ebadzad *et al*., 2015). گونه‌های فعال اکسیژن با تحریک تجزیه لیپیدهای اشباع‌نشده سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شده که درنتیجه ساختار، سیالیت و سلامت غشاء را تحت تأثیر قرار داده و موجب تنش اکسیداتیو می‌شود (Jin *et al*., 2015، Görgün *et al*., 2013).

مسیرهای متفاوتی در متابولیسم گیاه برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه محدود کردن پراکسیداسیون لیپید غشاء دخالت دارند که شامل افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی است (Liu *et al*., 2012، Wu *et al*., 2013). در بین آنزیم‌های آنتی-اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز رادیکال سوپراکسید را

www.SID.ir

Archive of SID

به پراکسید هیدروژن تبدیل کرده که باید به‌وسیله دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به آب و اکسیژن پاک‌سازی شود (Ozkur *et al*., 2009). آنزیم پراکسیداز همچنین به‌طور مستقیم در فرآیند لیگنینی شدن و حفظ یکپارچگی دیواره سلولی نقش داشته (Barros *et al*., 2015) و همچنین در جاروب کردن پراکسید هیدروژن نیز دخیل است (Fourquet *et al*., 2008).

در این پژوهش تحت تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به‌طور فراوانی افزایش یافت. همچنین تلقیح قارچ میکوریزی و ریزوباکتری با افزایش سطح خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. نتایج نشان داد در بعضی سطوح تأثیر قارچ میکوریز *ریزوفاگوس ایرگولاریس* به‌طور معنی‌داری بیشتر از ریزوباکتر *سودوموناس پوتیدا* بود.

گزارش‌های زیادی از تأثیر قارچ‌های میکوریزی روی القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش کم‌آبی وجود دارد. برای مثال، تلقیح قارچ میکوریزی آربوسکولار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در گیاه *Lycopersicon esculentum* L. تحت تنش شوری افزایش داد (Latef and Chaoxing, 2011). همچنین Alguacil و همکاران (2003) گزارش کردند که تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را در نهال‌های *Juniperus oxycedrus*. تلقیح یافته با قارچ میکوریزی آربوسکولار افزایش داد. Wu و همکاران (2007) بیان داشتند که وجود همزیستی میکوریز آربوسکولار، تحمل به خشکی *Citrus* sp را به‌وسیله توسعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای آنتی‌اکسیدانتی افزایش می‌دهد.

این مشاهدات مطابق با عقیده Bartels (2001) است که اظهار داشتند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان به‌منظور ممانعت از تنش اکسیداتیو و حذف گونه‌های اکسیژن فعال مؤثرترین راهکارهای استفاده‌شده توسط گیاه برای مقاومت در مقابل تنش خشکی است. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در *Lactuca sativa* تلقیح یافته با قارچ میکوریزی *Glomus deserticola* تحت هر دو حالت آبدهی خوب و تنش کم‌آبی افزایش نشان داده بود (Ruiz - Lozano *et al*., 1996). به‌طورکلی افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز یک اثر مستقیم از همزیستی میکوریز آربوسکولار در پاسخ به تنش خشکی در گیاه میزبان است، به‌طوری‌که با تلقیح آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد (Ruiz-Sunchez *et al*., 2011). به‌علاوه، پژوهش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر ریزوباکتری‌ها موجب مقاومت بیشتر گیاهان به تنش خشکی می‌شود (Verma *et al*., 2016). افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به‌منظور کاهش خسارات آکسیداتیو در گیاهان مختلف تحت تلقیح ریزوباکتر از طریق کاهش گونه‌های فعال اکسیژن گزارش‌شده است (Kohler, 2008، Fu *et al*., 2010، Gururani *et al*., 2013). Kohler و همکاران (2008) گزارش کردند که ریزوباکتر *Pseudomonas mendocina* موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گونه *Lactuca sativa* L. تحت تنش خشکی شد. گونه‌های مختلف سودوموناس با تثبیت ازت و افزایش تولید پرولین، اسیدهای آمینه، قندهای

www.SID.ir

Archive of SID

محلول و در نتیجه بهبود فرآیند جذب آب و مواد غذایی و همچنین تحریک ژن‌های بیان‌کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب کاهش اثرهای خشکی می‌شوند (Sandhya *et al*., 2010). ریزوباکترهای محرک رشد می‌توانند با افزایش فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن گیاه میزبان را در برابر تنش خشکی محافظت کنند (Samancioglu *et al*., 2016).

آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز متالوآنزیم (Metalloenzyme) هستند و عناصر غذایی میکرو می‌توانند بیان این آنزیم‌ها را تعیین کنند. در واقع، وفور یا کمبود عناصر ماکرو می‌تواند بیان متالوآنزیم‌ها را تعدیل کند (Alguacil *et al*., 2003). در نتیجه می‌توان بیان داشت که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نهال‌های تلقیح یافته با قارچ و ریزوباکترها ممکن است مربوط به حفظ بهتر تعادل یونی واکنش‌های فیتوشیمیایی در برگ تحت تنش خشکی باشد.

به‌طورکلی، تیمار تلقیح با میکوریز و ریزوباکتر موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در طول تنش خشکی شد. این نتیجه نشان می‌دهد که گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزی و ریزوباکتری‌ها مکانیسم‌هایی را برای اجتناب از خسارات اکسیداتیو به وجود آمده تحت شرایط کمبود آب توسعه می‌دهند. در واقع، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزی و ریزوباکترها نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها می‌توانند در اثرهای سودمند قارچ‌های میکوریزی و ریزوباکترها روی عملکرد رویشی گیاهان در شرایط تنش دخالت داشته باشند (Alguacil *et al*., 2003، Sandhya *et al*., 2010). روی‌هم‌رفته می‌توان گفت که قارچ میکوریز و ریزوباکترهای محرک رشد با تنظیم شاخص‌های بیوشیمیایی مانند تولید بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان می‌توانند توانایی اندام‌های هوایی و ریشه را برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه کاهش خسارات اکسیداتیو تحت شرایط خشکی افزایش دهند.

تشکر و قدردانی

از همکاری مسئولین محترم آزمایشگاه تکنولوژی جنگل و مرتع، گلخانه تحقیقاتی دانشکده منابع طبیعی تربیت مدرس نور، بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور و مرکز تحقیقات منابع طبیعی بوشهر و تمامی کسانی که به‌نحوی در پیشبرد این پژوهش مشارکت داشتند، نهایت سپاس را داریم.

References

- Alguacil, M. M., J. A. Hernandez, F. Caravaca, B. Portillo & A. Roldan, 2003. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil, *Physiologia Plantarum*, 118(4): 562-570.
- Auge, R. M., 2001. Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Mycorrhiza*, 11(1): 3-42.
- Auge, R. M., D. M. Sylvia, S. Park, B. Buttery, R. A. M. Saxton, J. L. Moore & K. Cho. 2004. Partitioning mycorrhizal influence on water relations of Phaseolus vulgaris into soil and plant components, *Canadian Journal of Botany*, 82(4): 503-514.
- Augé, R. M., J. L. Moore, K. Cho, J. C. Stutz, D. M. Sylvia, A.K. Al-Agely & A. M. Saxton, 2003. Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae, *Journal of Plant Physiology*, 160(10): 1147-1156.
- Bahmani, M., Gh. Jalali, A. Asgharzadeh & M. Tabari, 2015. Efficiency of Rhizobacteria inoculation of *Pseudomonus putida* 169 on the improvement of some vegetative traits of *Calotropis procera* Ait

www.SID.ir

Archive of SID

under drought stress, *Journal of Soil Biology*, 3(2): 107-117 (In Persian).
- Bahmani, M., M. Modaresi & M. Mohamadi, 2018. Comparison on efficiency of arbuscolar mycorrhizal fungus and plant growth promotion rhizobacterium inoculum on nutrition elements concentration and seedling quality indices of *Calotropis Procera*, *Journal of Desert Management*, 6(11): 51-64 (In Persian).
- Barros, J., H. Serk, I. Granlund & E. Pesquet, 2015. The cell biology of lignification in higher plants, *Annals of Botany*, 115(7): 1053-1074.
- Bartels, D., 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 6(7): 284-286.
- Dehghan, S., K. S. M. Tabari & G. Jalali, 2016. The effect of mycorrhizal fungi and growth-promoting rhizobacteria on the activity of antioxidant enzymes of Calotrope Seedlings under drought Stress, *Journal of Forest Research and Development*, 2(3): 289-299 (In Persian).
- Fitter, A. H., 1988. Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought, *Journal of Experimental Botany*, 39(5): 595-603.
- Fourquet, S., M. E. Huang, B. D'Autreaux & M. B. Toledano, 2008. The dual functions of thiol-based peroxidases in H_2O_2 scavenging and signaling, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9): 1565-1576.
- Fu, Q., L. Chen, N. Ding & B. Guo, 2010. Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas sp. DW1 on growth of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress, *Agricultural Water Management*, 97(12): 1994-2000.
- Gururani, M. A., C. P. Upadhyaya, V. Baskar, J. Venkatesh, A. Nookaraju & S. W. Park, 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS- Scavenging enzymes and improved photosynthetic performance, *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2): 245-258.
- Jia, J., S. Li, X. Cao, H. Li, W. Shi, A. Polle, T. Liu, C. Peng & Z. Luo, 2015. Physiological and transcriptional regulation in poplar roots and leaves during acclimation to high temperature and drought, *Physiologia Plantarum*, 157(1): 38-53.
- Jin, R., H. Shi, C. Han, B. Zhong, Q. Wang & Z. Chan, 2015. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration, *Scientia Horticulturae*, 194: 215-221.
- Kohler, J., F. Caravaca, L. Carrasco & A. Roldan, 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregates stabilisation and promotion of biological properties in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions, *Soil Use and Management*, 22(3): 298-304.
- Kohler, J., J. A. Hernandez, F. Caravaca & A. Roldan, 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants, *Functional Plant Biology*, 35(2): 141-151.
- Liu, B., M. Li, L. Cheng, D. Liang, Y. Zou & F. Ma, 2012. Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress, *Plant Growth Regulation*, 67(3): 247-256.
- Ouledali, S., M. Ennajeh, A. Zrig, S. Gianinazzi & H. Khemira, 2018. Estimating the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to drought tolerance of potted olive trees (*Olea europaea*), *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(5): 81-92.
- Ozkur, O., F. Ozdemir, M. Bor & I. Turkan, 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte Capparis ovata Desf. to drought, *Environmental and Experimental Botany*, 66(3): 487-492.
- Pilevar, B., M. Bahmani, Y. Yousefi, A. Asgharzadeh & D. Kartolinezhad, 2015. Efficiency of arbuscular mycorrhizal fungus on *Calotropis procera* Ait. gas exchange, Proceedings of Fourteenth Congress of Soil Science - Chemistry fertility and soil nutrition (In Persian).
- Pitman, M. G. & A. Lauchli, 2002. Global impact of salinity and agricultural ecosystems, *In: Salinity: Environment-Plants Molecules*, 3-20.
- Porcel, R., J. M. Barea & J. M. Ruiz-Lozano, 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of

www.SID.ir

Archive of SID

nodule senescence, *New Phytologist*, 157(1): 135-143.
- Requena, N., E. Perez-Solıs, C. Azcon-Aguilar, P. Jeffries & J. M. Barea, 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 495-498.
- Ruiz-Lozano, J. M., 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies, *Mycorrhiza*, 13(6): 309-317.
- Ruiz-Lozano, J. M., R. Azcon & J. M. Palma, 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal Lactuca sativa plants subjected to drought stress, *New Phytologist*, 134(2): 327-333.
- Ruiz-Sanchez, M., E. Armada, Y. Munoz, I. E. G. de Salamone, R. Aroca, J. M. Ruiz-Lozano & R. Azcn, 2011. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions, *Journal of Plant Physiology*, 168(10): 1031-1037.
- Saikia, R., R. Kumar, D. K. Arora, D. K. Gogoi & P. Azad, 2006. Pseudomonas aeruginosa inducing rice resistance against Rhizoctonia solani: production of salicylic acid and peroxidases, *Folia Microbiologica*, 51(5): 375-380.
- Samancioglu, A., E. Yildirim, M. Turan, R. Kotan, U. Sahin & R. Kul, 2016. Amelioration of Drought Stress Adverse Effect and Mediating Biochemical Content of Cabbage Seedlings by Plant Growth Promoting Rhizobacteria, *International Journal of Agriculture & Biology*, 18(5): 948-956.
- Sanchen-Blanco, M. J., T. Ferrandez, M. A. Morales, A. Morte & J. Alarcon, 2004. Variations in water status, gas exchange, and growth in Rosmarinus officinalis plants with Glomus deserticola under drought conditions, *Journal of Plant Physiology*, 161(6): 675-682.
- Sandhya, V., Sk. Z. Ali, G. Minakshi, R. Gopal & B. Venkateswarlu, 2010. Effect of plant growth promoting Pseudomonas spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress, *Plant Growth Regul*, 62(1): 21-30.
- Shi, H., T. Ye, B. Song, X. Qi & Z. Chan, 2015. Comparative physiological and metabolomic responses of four *Brachypodium distachyon* varieties contrasting in drought stress resistance, *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(6): 1-12.
- Talbi, S., M. C. Romero-Puertas, A. Hernández, L. Terrón, A. Ferchichi & L. M. Sandalio, 2015. Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: Role of antioxidant defences, *Environmental and Experimental Botany*, 111: 114-126.
- Verma, P., R. Saxena & R. S. Tomar, 2016. Rhizobacteria: A Promising Tool for Drought Tolerance in Crop Plants, *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 21: 116-125.
- Wu, M., W. H. Zhang, C. Ma & J. Y. Zhou, 2013. Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in chinese cork oak (*Quercus variabilis* Bl.) seedlings, *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(5): 681-692.
- Wu, Q. S., R. X. Xia, Y. N. Zou & G. Y. Wang, 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(6): 543-553.
- Zhang, F., Y. N. Zou & Q. S. Wu, 2018. Quantitative estimation of water uptake by mycorrhizal extraradical hyphae in citrus under drought stress, *Scientia Horticulturae*, 229: 132-136.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of mycorrhizal fungi and growth-promoting rhizobacteria on the activity of antioxidant enzymes of Calotrope seedlings under drought stress

E. Ghanbary1, O. Fathizadeh[*2] and M. Tabari[3]

1- Ph.D. of Forestry, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I. R. Iran. (ehsan.ghanbary29@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Department of Forestry, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Ahar, I. R. Iran. (omid.fathizadeh@yahoo.com)
3- Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I. R. Iran. (mtabari@modares.ac.ir)

Received: 18.02.2019 Accepted: 25.04.2019

Abstract

This study aimed to investigate the antioxidant enzyme activities such as catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase in Calotrope seedlings (*Calotropis procera* Ait) inoculated with mycorrhizal and Rhizobacterial microorganisms affected by drought stress under greenhouse conditions during a six-month period. Experiment in three inoculation levels (non-inoculated or control, *Rhizophagus irregularis* mycorrhizal fungi and *Pseudomonas putida* Rhizobacterial) and with three levels of drought durations (3, 6, and 12 days irrigation) in a completely randomized design with three replications was conducted. Results revealed that inoculation of mycorrhiza and *Pseudomonas* Rhizobacterial under drought stress significantly increased the activity of antioxidant enzymes. Maximum activity of catalase (1.57 units of enzyme per mg of fresh weight), superoxide dismutase (17.43 units of enzyme per mg of fresh weight) and ascorbate peroxidase (4.56 units of enzyme per mg of fresh weight) in mycorrhizal seedlings under drought stress for 12 days and also highest amount of peroxidase activity in *mycorrhizal* (11.96 units of enzyme per mg of fresh weight) and *Rhizobacterial* (12.9 units of enzyme per mg of fresh weight) seedlings under drought conditions for 12 days were observed.

Keywords: Active oxygen species, Oxidative stress, Pseudomonas, *Rhizophagus irregularis*.

[*] Corresponding author Tel: +989184656288

www.SID.ir