

تأثیر قارچ‌های میکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) در شرایط کمبود آب

فاروق سلیمانی^۱ و علیرضا پیرزاد^{۲*}

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

پست الکترونیک: a.pirzad@urmia.ac.ir و pirzadalireza@gmail.com

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳

چکیده

بعضی از گیاهان زراعی از قابلیت مقاومت در برابر تنش‌های محیطی برخوردارند، به طوری که با مکانیزم عمل خود مانع از تولید بیشتر اکسیژن‌های رادیکال آزاد شده و یا با اکسیژن‌های رادیکال آزاد تولیدی مقابله می‌کنند. بر این اساس، به منظور بررسی اثر گونه‌های قارچی با رابطه میکوریزایی بر خصوصیات اکوفیزیولوژیکی گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.)، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در سال زراعی ۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل گونه‌های قارچ میکوریزا (*G. intraradices*, *G. claroideum*, *G. fasciculatum*, *Acaulospora longula* و شاهد بدون میکوریزا) و آبیاری در چهار سطح (آبیاری در ۸۰، ۷۰، ۶۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) بودند. نتایج آزمایش نشان داد که اثر آبیاری و میکوریزا بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز، و اثر متقابل بین آبیاری و میکوریزا روی درصد کلونیزاسیون، فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بود. ترتیب بیشترین میزان آلودگی ریشه زوفا با *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum*، *G. claroideum* و *A. longula* در مقایسه با شاهد بود که با افزایش شدت تنش درصد کلونیزاسیون با همین ترتیب افزایش بیشتری داشت. بالاترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگ گیاهان تلقیح شده با *G. mosseae*، *G. fasciculatum*، *G. claroideum* و به ترتیب در ظرفیت‌های زراعی ۵۰، ۶۰، ۵۰ و ۵۰ بدست آمد. بیشترین میزان آسکوربات پراکسیداز هم متعلق به آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود. به طور کلی نتایج این بررسی حکایت از آن داشت که گونه‌های میکوریزا با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد، افزایش پایداری غشاء سلولی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تعدیل تنش کمبود آب مؤثر بودند.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، زوفا (*Hyssopus officinalis* L.)، سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت زراعی، کاتالاز.

مقدمه

H. canescens D.S. *H. altissimus* Mill. L. و

H. angustifolius M.B. است که مهمترین آنها

H. officinalis می‌باشد. در بیشتر فرماکوپه‌های معتبر از

جنس زوفا (*Hyssopus*) از خانواده نعناعیان

(Lamiaceae) دارای چهار گونه *Hyssopus officinalis*

انواع مختلف ریز موجودات آزادی بوده که توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیرقابل دسترس به فرم قابل دسترس طی فرایندهای بیولوژیکی دارند و لازم است مدیریت تغذیه گیاهی در جهت افزایش و پایداری تولید باشد و هم سبب حفظ محیط‌زیست گردد (Vessey, 2003; Kazazi et al., 2007). قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا (AMF) جزء اصلی فلور محیط ریشه گیاهان در بوم نظام‌های طبیعی می‌باشند (Panwar & Tarafdar, 2006)، که رابطه همزیستی با بیشتر نهادانگان دارند (Venkateshwar et al., 2000). همزیستی قارچی مواد کربوهیدراتی را عمدتاً به شکل ساکارز از گیاه دریافت می‌کند و آب و عناصر غذایی عمدتاً فسفر را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (Smith et al., 2010).

در تحقیق Habibzadeh و همکاران (۲۰۱۳) درصد آلودگی ریشه با *G. intraradices* بین ۲۶/۹۰٪ تا ۴۸/۷۳٪ و برای *G. mosseae* بین ۲۱/۹۵٪ تا ۴۰/۸۶٪ متغیر بود، که با افزایش فواصل آبیاری از ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌متر تبخیر از تشت تبخیر کاهش یافت. به‌طور کلی میزان آلودگی ریشه ماش با *G. intraradices* در مقایسه با *G. mosseae* بیشتر بود و با افزایش تنش کم‌آبی درصد کلونیزاسیون *G. intraradices* نسبت به *G. mosseae* کمتر کاهش یافت.

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی هستند که آخرین لایه الکترونی آنها تکمیل نبوده، از این‌رو از نظر شیمیایی فعال‌تر از دیگر مولکول‌ها می‌باشند و می‌توانند به‌طور مستقل وجود داشته باشند. رادیکال آزاد در واکنش با مولکول‌های دیگر الکترون دریافت می‌کند و به حالت پایداری می‌رسد ولی در عوض آن مولکول تبدیل به رادیکال می‌شود. گیاه دارای مکانیزم‌های متفاوتی برای حذف یا کاهش این ترکیب‌های مخرب می‌باشد. یکی از سیستم‌های تدافعی افزایش آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است که قادرند اکسیژن رادیکال آزاد را حذف، خنثی یا تمیز کنند (Bayer et al., 1991). برخی گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی

بیکر رویشی زوفا به‌عنوان دارو یاد شده‌است و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که در آثار تئوفراست، بقراط و دیوسکورید آمده‌است. زوفا گیاهیست چندساله (۵ تا ۷ ساله)، خشبی با ارتفاع ۴۰ تا ۷۰ سانتی‌متر، دارای برگ‌های باریک و کوچک که به صورت متقابل بر روی ساقه‌ای چهارگوش قرار دارند. pH خاک برای زوفا بین ۵ تا ۷/۵ مناسب است (Kreis et al., 1992; Ambasta et al., 1990). تحقیقات قبلی نشان داده که رنگ گل در ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس تأثیری نداشته و ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده آن پینوکامفن (Pinocamphene)، آلفا و بتا-پینن (Pinene and Camphene)، دیوزمین (Diosmin)، هیسوپین (Hyssopin) و الکلهای سزکویی‌ترین است (Haji Sharifi, 2013).

آب یکی از مهمترین عوامل محیطی است که تأثیر عمده‌ای بر رشد، نمو و مواد مؤثره گیاهان دارویی دارد (Zhua et al., 2009). محققان در تحقیقات خود نشان دادند که تنش‌های محیطی باعث افزایش سطوح متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌شود (Zobayed et al., 2005). محققان دیگر در تحقیقات خود بر روی گیاهان دارویی نشان دادند که تنش کم آبی باعث کاهش شدید عملکرد در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، نعناع (*Mentha piperita* L.) (Delfine et al., 2005) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) (Bettaieb et al., 2009) می‌شود. بنابراین، با توجه به هدف کشت محصول، به‌منظور رسیدن به حداکثر عملکرد در شرایط تنش می‌توان به جای آبیاری کامل، برنامه‌ای مناسب برای مصرف بهینه آب بکار برد و تنها در مراحل بحرانی از آب استفاده کرد، در این صورت تأثیر خشکی کاهش می‌یابد (Kamkar et al., 2011).

در حال حاضر کودهای بیولوژیک به‌عنوان جایگزین برای کودهای شیمیایی، به‌منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات در کشاورزی پایدار مطرح شده‌اند (Wu et al., 2005). کودهای بیولوژیک در حقیقت ماده‌ای شامل

آنزیمی گیاه به تنش خشکی در شرایط متفاوت همزیستی با قارچ‌های میکوریزا، بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و درصد کلونیزاسیون با ریشه زوفا در شرایط متفاوت آبیاری و در همزیستی با ۵ گونه قارچ میکوریزایی از اهداف اصلی این پژوهش می‌باشد.

مواد و روشها

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر گونه‌های قارچ‌های میکوریزایی در شرایط تنش کم‌آبی بر عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی زوفا در قالب آزمایش‌های فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در سال زراعی ۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی (پیرانشهر) اجرا شد. بعد از اعمال دو سال متوالی تنش‌های کم‌آبی، در سال زراعی دوم اندازه‌گیری آنزیم‌ها انجام شد. در این تحقیق تیمارهای آزمایش شامل گونه‌های قارچ میکوریزا در شش سطح (*Glomus G. fasciculatum*, *G. intraradices*, *G. mosseae* و *Acaulospora longula clarioideum*) و شاهد بدون میکوریزا) و تیمار آبیاری مختلف در چهار سطح (آبیاری در ۸۰، ۷۰، ۶۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) بودند. گونه‌های قارچ میکوریزا از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و از آقای دکتر محمدی گل‌تپه (از گیاه‌میزبان ذرت) تهیه گردید. به منظور از بین بردن اثرات حاشیه‌ای ناشی از نفوذ آب و کاهش خطا، فاصله کرت‌های مجاور را از یکدیگر ۲ متر و فاصله بین بلوک‌ها را ۲ متر در نظر گرفته بودیم. در هر کرت آزمایشی به مساحت ۶ مترمربع با ۵ ردیف کشت به فاصله ۴۰ سانتی‌متر از هم و فاصله بوته‌ها در روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر بود. سپس با توجه به وضعیت جوی منطقه در اواخر فروردین، در هر کرت ۵ شیار طولی به عمق ۳-۲ سانتی‌متر به منظور ریختن گونه قارچ (۱۵۰ گرم در هر کرت) ایجاد کرده، سپس در فاصله‌های مشخص اقدام به بذرکاری به عمق ۱/۵-۱ سانتی‌متر کردیم. بعد از بذرکاری (اول اردیبهشت) تا مرحله جوانه‌زنی آبیاری برای کلیه واحدهای آزمایشی یکسان انجام شد. بعد از شش

هستند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) است و سیستم غیرآنزیمی شامل آسکوربات، توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، مانیتول‌ها و پلی‌فن‌ها می‌باشد (Qinghua & Zhujun, Blokhin et al., 2003). یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش‌های غیرزیستی ایجاد می‌شود، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (HO^\cdot) در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است (Venkateshwar et al., 2000). آسکوربات اولین آنتی‌اکسیدانت مهمی است که به طور مستقیم با پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل، سوپراکسید و اکسیژن یکتایی واکنش می‌دهد و نقش مهمی در حفاظت کلروپلاست سلول‌های گیاهی در برابر آسیب اکسیداتیو دارد (Smirnoff & Wheeler, 2000). سوپراکسید دیسموتاز یک آنتی‌اکسیدان قوی است که اولین ماده تولید شده از احیاء یک ظرفیتی اکسیژن، یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد (Bhattacharjee & Mukherjee, 2002). اطلاعات و بررسی‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم SOD در سلول‌ها، در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی و تنش‌های غیرزیستی مانند پاراکوات، شدت نور بالا، شوری و خشکی افزایش پیدا می‌کند (Habibi et al., 2004). Ghorbanli و همکاران (2012) در پژوهشی با بررسی اثر تنش خشکی و برهم‌کنش آن با آسکوربات در گیاه کتان نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش و فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان پرولین در تیمارهای تنش خشکی در مقایسه با شاهد افزایش یافت.

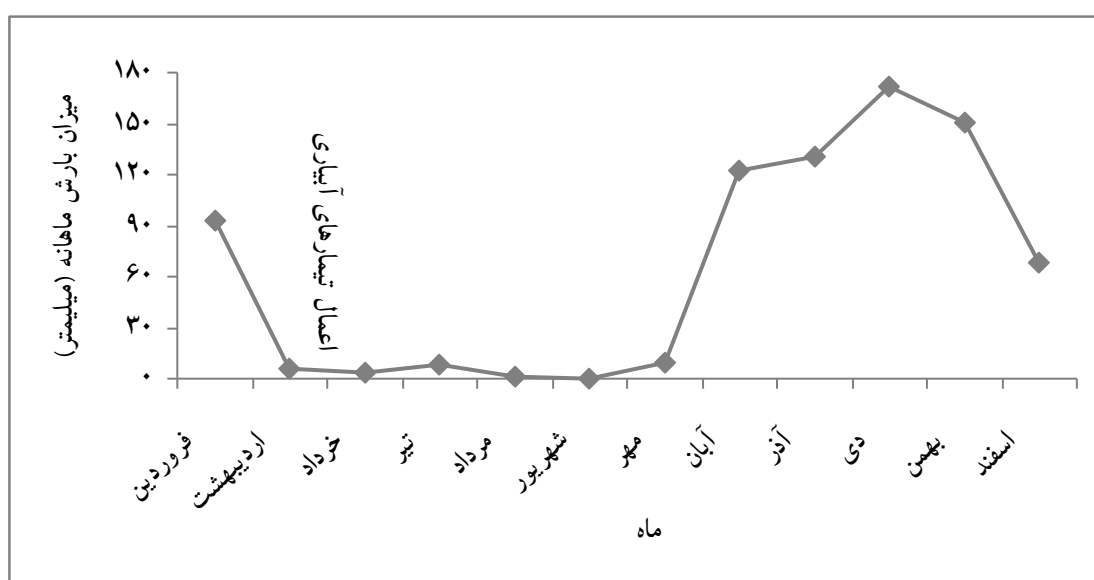
در این تحقیق به بررسی میزان فعالیت مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و برخی از صفات اکوفیزیولوژیک گیاهی و نقش کودهای بیولوژیک در گیاه دارویی زوفا در سطوح مختلف تنش خشکی پرداخته شد. همچنین میزان تغییرات این مواد بیوشیمیایی در همزیستی با گونه‌های مختلف قارچ میکوریزایی بررسی گردید. بنابر اهمیت پاسخ

محل آزمایش، رطوبت خاک در زمان آبیاری، A مساحت کرت و h عمق نفوذ ریشه می باشد. نمودار بارش های محل آزمایش همراه با نمایش شروع اعمال تیمارهای آبیاری در شکل ۱ و ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ ارائه شده اند.

برگه شدن گیاه تیمارهای آبیاری در چهار سطح با اندازه گیری ظرفیت مزرعه مقدار آب مورد نیاز هر کرت ($V_n = (FC -) \times (A \times h)$) محاسبه شده و به وسیله کنتور، آب کرت ها تا مرحله گلدهی آبیاری شدند، که در آن میزان آب مورد نیاز هر واحد آزمایشی، FC ظرفیت زراعی خاک

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

عمق نمونه برداری (cm)	هدایت الکتریکی ($EC \times 10^3$)	اسیدیته خاک (pH)	کربن آلی (%OC)	ازت (%)	فسفر (Ppm)	پتاسیم (Ppm)	شن (%)	لای (%)	رس (%)	بافت خاک
۰-۳۰	۰/۴	۷/۵	۱/۱	۰/۱۱	۱۰/۸	۳۸۵	۱۰	۳۸	۵۲	رسی لومی



شکل ۱- نمودار بارش های محل آزمایش همراه با نمایش شروع اعمال تیمارهای آبیاری

دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از سرد شدن، ریشه ها شسته شده و به مدت ۳ دقیقه در اسید کلریدریک ۱٪ گذاشته شدند و بعد بر روی آن محلول رنگی (تربان بلو ۰/۰۵٪) اضافه گردید و به مدت یک ربع در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و بعد محلول رنگی خالی شد و پس از آن محلول رنگ زدایی لاکتوگلیسرول (۱:۱:۱ اسید لاکتیک، گلیسرول، آب) به آنها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد در داخل حمام آب قرار داده شدند. سپس

اندازه گیری درصد کلونیزاسیون قارچ بر روی ریشه در مرحله انتهایی رشد، ریشه ۱۰ بوته از هر تیمار به طور تصادفی برداشت و پس از شستن ریشه ها، حدود یک گرم از ریشه های ظریف و ریز در محلول FAA (۱۳ میلی لیتر فرمالدئید غلیظ + ۵ میلی لیتر اسید استیک غلیظ + ۹۰ میلی لیتر اتانول ۵۰٪) قرار داده شدند تا نمونه ها تثبیت شوند. به منظور رنگ آمیزی، ریشه ها با آب معمولی شسته شده و بعد قطعات ریشه (به طول یک سانتی متر) در داخل KOH ۱۰٪ به مدت یک ساعت و در

بافر تریس (حاوی فسفات دی سدیک، $\text{pH}=7/2$) به همراه $1/3$ میلی مول EDTA و $0/1$ میلی مول کربنات منوسدیک تهیه شد و بعد از اپی نفرین با غلظت $0/25$ میلی مول به عنوان سوستر استفاده شد؛ سپس محلول تهیه شده را به آن اضافه کرده، و تغییرات جذب نوری حاصل از اکسیداسیون اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی گردید و از آنزیم استاندارد و خالص برای استاندارد کردن نتایج استفاده شد که واحد آن قادر به اکسیداسیون $0/5$ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه باشد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

مقدار فعالیت این آنزیم به کمک روش Ranieri و همکاران (۲۰۰۳) سنجیده شد. محیط واکنش حاوی 600 میکرو لیتر از EDTA $0/1$ مولار و 1500 میکرو لیتر بافر فسفات $0/5$ مولار $\text{pH}=7$ ، 400 میکرو لیتر آسکوربیک اسید $0/5$ میلی مولار، 400 میکرو لیتر H_2O_2 30% و 100 میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. منحنی تغییرات جذب در طول موج 290 نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین ($\text{A} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$) و بر اساس تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه گردید.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

برای اندازه گیری آنزیم کاتالاز از روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) استفاده شد. به این منظور مخلوط واکنش شامل $0/75$ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم 100 میلی مولار با $\text{pH}=7$ ، 20 میکرو لیتر پروتئین محلول و 1500 میکرو لیتر آب دو بار تقطیر به کووت کوارتز اضافه شد و به هنگام اندازه گیری آنزیم 750 میکرو لیتر H_2O_2 70 میلی مولار به مخلوط واکنش اضافه گردید. سپس تغییرات جذب در 240 نانومتر به مدت 60 ثانیه در 25 درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر

ریشه ها به پتری دیش های حاوی 50% گلیسرول برای مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری منتقل شدند. محلول رنگبر تمام مواد رنگی را از بافت ریشه بجز اندام های قارچی خارج می کند و در نتیجه اندام های قارچی به رنگ آبی در داخل و خارج ریشه به طور مشخص دیده می شوند (Phillips & Hayman, 1970). برای تعیین درصد کلونیزاسیون ریشه ها از روش تلاقی خطوط مشبک استفاده شد (Giovannetti & Mosse, 1980).

استخراج آنزیم ها

برای استخراج و سنجش پروتئین از روش Benavides و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. 5 گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوای 5 میلی لیتر بافر تریس- 5HCL نرمال با pH معادل $7/5$ و به مدت 30 دقیقه در حمام یخ کاملاً ساییده شد. سپس مخلوط همگن حاصل در لوله سانتریفوژ ریخته و 10 دقیقه به حالت سکون نگهداری شد. آنگاه به مدت 20 دقیقه در دور 13000 و دمای 4 درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه سانتریفوژ یخچال دار، عمل سانتریفوژ نمونه ها انجام شد (Sudhakar et al., 2001). برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از آنجا که این آنزیم در غیاب آسکوربات بسیار ناپایدار می باشد، به بافر عصاره گیری فوق $0/2$ میلی لیتر آسکوربات 5 میلی مولار اضافه شد و تمامی مراحل همانند سایر آنزیم ها انجام گردید. در پایان مرحله سانتریفوژ لوله ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی صاف شده و از عصاره های پروتئینی حاصل برای بررسی فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

برای اندازه گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از روش Misra و Fridovich (۱۹۷۲) استفاده شد. ابتدا محلول

بالاترین سطح فعالیت آنزیم مربوط به تیمار غیرمیکوریزا به میزان ۳۰/۲۲ تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین می‌باشد (جدول ۳).

درصد کلونیزاسیون

درصد آلودگی ریشه با *G. fasciculatum* بین ۳۰/۵۹٪ تا ۲۷/۶۲٪، برای *G. mosseae* بین ۵۱/۲۶٪ تا ۴۸/۹۹٪، برای *G. intraradices* بین ۲۸/۸۸٪ تا ۴۵/۵۳٪ و برای *A. longula* بین ۱۸/۴۴٪ تا ۴۲/۴۴٪ متغیر بود، که با بالا رفتن سطح تنش کم آبی کاهش یافت (جدول ۴).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بالاترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاهان تلقیح شده با *G. mosseae* (۱۵۷/۹) واحد در میلی‌گرم پروتئین) بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با کمترین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاهان تلقیح شده با *A. longula* (۷۸/۳۹) واحد در میلی‌گرم پروتئین) داشته‌است. لازم به یادآوریست که میزان افزایش فعالیت این آنزیم در هر سطح آبیاری در مقایسه با شاهد متفاوت است (جدول ۴).

آنزیم کاتالاز

بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهان تلقیح شده با *G. fasciculatum* (۲۱/۸۴) تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ظرفیت زراعی ۶۰٪ بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهان تلقیح شده با *A. longula* (۹/۹۳) تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در ظرفیت زراعی ۸۰٪ بدست آمد، داشته‌است (جدول ۴).

قرائت شد. تغییرات آنزیمی برحسب تغییرات در جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. کووت شاهد نیز شامل ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات و ۲۰ میکرولیتر پروتئین محلول بود.

داده‌های آزمایش براساس امید ریاضی طرح پایه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسات میانگین‌ها با آزمون SNK انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر گونه‌های قارچی روی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۵٪ (p ۰/۰۵) و روی درصد کلونیزاسیون و میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در سطح احتمال ۱٪ (p ۰/۰۱) معنی‌دار شد. اثر سطوح مختلف تنش کمبود آب روی درصد کلونیزاسیون و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. اثر متقابل بین تنش کمبود آب و میکوریزا روی درصد کلونیزاسیون و کاتالاز در سطح احتمال ۵٪ و روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار و بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز غیرمعنی‌دار بود (جدول ۲).

آسکوربات پراکسیداز

با بالا رفتن سطح تنش آبی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش پیدا کرد. بالاترین فعالیت آنزیم APX در برگ گیاهان تلقیح شده با *G. fasciculatum* (۲۷/۰۶) تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با کمترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاهان تلقیح شده با *G. mosseae* (۲۳/۳۴) تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) داشته‌است، که

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف آبیاری و میکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه زوفا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد کلونیزاسیون	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز
تکرار	۲	۲۰۳/۱۷ **	۲۵۱/۲۱	۱/۱۱
آبیاری	۳	۱۷۳۸/۸۴ **	۴۴۶۰/۸۰ **	۶۱/۶۲ **
میکوریزا	۵	۱۱۲۷/۰۶ **	۱۶۳۶/۷۸ *	۵۷/۷۴ **
آبیاری × میکوریزا	۱۵	۶۰/۱۷*	۱۶۷۰/۱۹ **	۱۶/۲۷
اشتباه	۴۶	۲۶/۲۶	۵۳۱/۵۵	۱۱/۳۲
ضریب تغییرات (%)		۱۵/۱۰	۱۸/۵۶	۱۲/۵۸

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه زوفا

تحت تأثیر رژیم‌های مختلف آبیاری و میکوریزا

تیمار	آسکوربات پراکسیداز ($A \cdot mg^{-1} \cdot protein \cdot min^{-1}$)
ظرفیت مزرعه (FC)	
۵۰	۲۹/۴۶ a
۶۰	۲۶/۱۳ b
۷۰	۲۶/۰۱ b
۸۰	۲۵/۳۳ b
میکوریز	
<i>G. mousseae</i>	۲۳/۳۴ b
<i>G. intraradicese</i>	۲۶/۲۸ b
<i>G. fasciculatum</i>	۲۷/۰۶ ab
<i>G. claroideum</i>	۲۶/۹۸ ab
<i>A. longula</i>	۲۶/۵۳ b
شاهد	۳۰/۲۲ a

اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های تأثیر رژیم‌های مختلف آبیاری و میکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گیاه زوفا

کاتالاز A.mg ⁻¹ protein.min ⁻¹	سوپراکسید دیسموتاز unit/mg protein	کلونیزاسیون (%)	گونه قارچ همزیست	آبیاری درصد ظرفیت زراعی
۱۹/۸۱ ab	۱۵۷/۹ a	۳۰/۵۹ f-j	<i>G. mousseae</i>	۵۰
۲۰/۲۱ ab	۱۵۵/۹ a	۲۸/۸۸ g-k	<i>G. intraradicese</i>	
۲۰/۸۹ ab	۱۲۵/۹ abc	۲۷/۶۲ h-k	<i>G. fasciculatum</i>	
۱۷/۲۹ a-e	۱۴۲/۳ abc	۲۰/۱۶ j-l	<i>G. claroideum</i>	
۲۰/۸۲ ab	۱۱۰/۱ abc	۱۸/۴۴ j-l	<i>A. longula</i>	
۱۹/۹۵ ab	۱۱۷/۷ abc	۱۲/۷۹ l	شاهد	۶۰
۱۶/۴۸ a-e	۱۰۹/۴ abc	۳۴/۵۵ d-i	<i>G. mousseae</i>	
۱۲/۵۶ a-e	۹۱/۳ abc	۳۳/۳۴ e-i	<i>G. intraradicese</i>	
۲۱/۸۴ a	۷۹/۵ c	۳۵/۸۹ c-i	<i>G. fasciculatum</i>	
۱۴/۹۰ a-e	۱۵۳/۸ abc	۲۷/۲۲ h-k	<i>G. claroideum</i>	
۱۵/۸۹ a-e	۱۳۴/۵ abc	۲۲/۹۶ i-l	<i>A. longula</i>	۷۰
۱۹/۱۸ abc	۱۳۳/۰ abc	۱۶/۳۲ kl	شاهد	
۱۵/۶۷ a-e	۱۳۳/۴ abc	۵۱/۲۶ ab	<i>G. mousseae</i>	
۱۸/۷۴ a-d	۱۵۵/۷ a	۴۵/۵۳ b-g	<i>G. intraradicese</i>	
۱۶/۴۶ a-e	۱۴۷/۸ abc	۴۷/۴۶ a-d	<i>G. fasciculatum</i>	
۱۰/۲۶ c-e	۱۴۰/۶ abc	۴۶/۴۴ a-e	<i>G. claroideum</i>	۸۰
۱۵/۵۱ a-e	۱۳۵/۸ abc	۳۷/۶۴ b-h	<i>A. longula</i>	
۱۹/۴۱ abc	۱۳۱/۶ abc	۱۸/۰۲ j-l	شاهد	
۸/۵۱ e	۸۱/۷ c	۵۰/۶۸ ab	<i>G. mousseae</i>	
۱۲/۰۶ b-e	۸۳/۶ bc	۴۸/۹۹ abc	<i>G. intraradicese</i>	
۱۷/۰۶ a-e	۱۰۵/۷ abc	۵۷/۶۶ a	<i>G. fasciculatum</i>	۸۰
۱۳/۶۵ a-e	۱۲۹/۹ abc	۴۵/۵۳ a-e	<i>G. claroideum</i>	
۹/۹۳ de	۷۸/۴ c	۴۲/۴۴ b-f	<i>A. longula</i>	
۱۰/۵۲ cde	۱۴۶/۴ abc	۱۸/۲۵ j-l	شاهد	

اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

بحث

درصد کلونیزاسیون *A. longula* نسبت به گونه‌های دیگر کمتر و درصد کلونیزاسیون *G. fasciculatum* بیشتر بوده‌است. Habibzadeh و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی واکنش مزرعه‌ای ماش تلقیح شده با دو گونه میکوریزا

نتایج این بررسی حکایت از آن دارد که میزان آلودگی ریشه زوفا با *G. intraradices* و *G. mosseae* در مقایسه با گونه‌های دیگر بیشتر بود و با افزایش سطح تنش کم‌آبی

- Council of Science and Industrial Research (CSIR), New Delhi, 918p.
- Bayer, W., Imlay, J. and Fridovich, I., 1991. Superoxide dismutase. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 40: 221-253.
 - Benavides, F.G., Benach, J., Diez-Roux, A.V. and Roman, C., 2000. How do types of employment relate to health indicators? Finding from the second European survey on working conditions. Journal of Epidemiology and Community Health, 54: 494-501.
 - Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi Wannes, W., Kchouk, M. E. and Marzouk, B., 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. Scientia Horticulturae, 120(2): 271-275.
 - Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A.K., 2002. Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. Seed Science and Technology, 30: 279-287.
 - Blokhin, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K., 2003. Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annals of Botany, 91(2): 179-194.
 - Chance, B. and Maehly, A.C., 1995. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, 2: 764-775.
 - Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R. and Alvino, A., 2005. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. Agriculture, Ecosystems and Environment, 106(2-3): 243-252.
 - Ghorbanli, M., Bakhshi Khaniki, Gh. and Zakeri, A., 2012. Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27(4): 647-658.
 - Giovannetti, M. and Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84: 489-500.
 - Habibi, D., Mashdi Akbar Boojar, M., Mahmoudi, A., Ardakani, M.R. and Taleghani, D., 2004. Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September-1 October: 1-4.
 - Habibzadeh, Y., Pirzad, A., Zardashti, M.R., Jalilian, J. and Eini, O., 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on seed and protein yield under water-deficit stress in mung bean. Agronomy Journal, 105: 79-84.

آربوسکولار، به طور کلی میزان آلودگی ریشه ماش با *G. intraradices* در مقایسه با *G. mosseae* بیشتر بود و با افزایش تنش کم آبی درصد کلونیزاسیون *G. intraradices* نسبت به *G. mosseae* کمتر کاهش یافت. با افزایش سطح تنش کم آبی در گیاه زوفا میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) افزایش یافته، و تنش خشکی سبب القاء فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت مذکور در گونه مورد مطالعه با توجه به میزان سطح آبیاری شده است، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم نیز در ظرفیت زراعی ۵۰٪ مشاهده شده است. به عنوان یک نتیجه گیری کلی می توان گفت که سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش خشکی بیشتر از سایر سطوح است که نشان دهنده اثرات مفید این آنزیم در کاهش صدمات تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی می باشد. البته فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ، همراه با افزایش تنش آبی، افزایش تدریجی را نشان داد، که این امر حکایت از آن داشت که گونه های میکوریز در تعدیل تنش نقش داشته اند. در بررسی نحوه بیان ژن کاتالاز در زمان پیری گیاه کلزا گزارش شده است که میزان بیان ژن کاتالاز و فعالیت آن در زمان پیری افزایش پیدا می کند. از این رو نتیجه گیری کردند که کاتالاز آنزیم مؤثری در مقابله با تنش اکسیدکنندگی می باشد (Haddad *et al.*, 2004). Imam و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی واکنش بیوشیمیایی گندم به تنش خشکی، مشاهده کردند که میزان کاتالاز برگ در شرایط تنش با سپری شدن زمان بعد از گلدهی، به صورت خطی افزایش یافت و این در حالی بود که میزان کاتالاز در شرایط آبیاری معمولی در دوره بعد از گلدهی تغییر محسوسی نشان نداد. بنابراین در طی افزایش تنش کم آبی، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب های وارد شده به گیاه و حفظ هموستازی افزایش یافت (Yong Kim *et al.*, 2005).

منابع مورد استفاده

- Ambasta, S.P., Ramchandran, K., Kashyapa, K. and Chand, K., 1992. The Useful Plants of India.

- production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2529-40.
- Smirnoff, N. and Wheeler, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Review of Plant Sciences*, 19: 267-290.
 - Smith, S.E., Facelli, E. and Pope, S., 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 326: 3-20.
 - Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3): 613-619.
 - Venkateshwar Rao, G.C., Manoharachary, C., Kunwari I.K. and Rajeshwar Rao, B.R., 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with some economically important spices and aromatic plants. *Philippine Journal of Science*, 129: 1-5.
 - Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
 - Wu, S.C., Caob, Z.H., Lib, Z.G., Cheunga K.C. and Wong, M.H., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125: 155-166.
 - Yong Kim, S., Lim, J.H., Park, M.R., Kim, Y., Won Seo, Y., Choi K.G. and Yun, S.J., 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 218-224.
 - Zhua, Z., Lianga, Z., Hana, R. and Wang, X., 2009. Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC.: Growth and saikosaponin production. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3): 629-633.
 - Zobayed, S.M.A., Afreen, F. and Kozai, T., 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10-11): 977-984.
 - Haddad, R., Morris, K. and Buchanan-Wollaston, V., 2004. Expression analysis of genes related to oxidative protection during senescence in *Brassica napus*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2: 269-278.
 - Haji Sharifi, A., 2013. Herbs Secrets. Hafez Novin, Tehran, 944p (In Persian).
 - Imam, Y., Karimzadeh Soreshjani, H., Mouri, S. and Maghsoudi, K., 2013. Biochemical responses of two wheat cultivars to late season drought stress and auxin and cytokinin application. *Journal of Plant Process and Function*, 2(1): 65-74.
 - Kamkar, B., Daneshmand, A.R., Ghooshchi, F., Shiranirad, A.H. and Safahani Langeroudi, A.R., 2011. The effects of irrigation regimes and nitrogen rates on some agronomic traits of canola under a semiarid environment. *Agricultural Water Management*, 98(2): 1005-1012.
 - Kazazi, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S.J., Emam-Djomeh Z. and Yamini, Y., 2007. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Iran. *Food Chemistry*, 105: 805-811.
 - Kreis, W., Kaplan, M.H., Freeman, J., Sun, D.K. and Sarin, P.S., 1990. Inhibition of HIV replication by *Hyssop officinalis* extracts. *Antiviral Research*, 14(6): 323-337.
 - Misra, H. P. and Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical during auto oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 247: 6960-6966.
 - Panwar, J. and Tarafdar, J.C., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungal dynamics under [*Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth.] in Thar desert. *Applied Soil Ecology*, 34: 200-208.
 - Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55:158-161.
 - Qinghua, S.H. and Zhujun, Z., 2008. Effect of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 317-326.
 - Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. and Soldatini, G.F., 2003. Early

The effect of mycorrhizal fungi on the oxidant enzymes activity in the medicinal herb, hyssop, under water deficit conditions

F. Soleymani¹ and A.R. Pirzad^{2*}

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2*- Corresponding author, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

E-mail: a.pirzad@urmia.ac.ir; pirzadalireza@gmail.com

Received: June 2014

Revised: August 2014

Accepted: September 2014

Abstract

Some crops have the ability to withstand environmental stresses as they prevent further production of oxygen free radicals or cope with the produced free radicals. Accordingly, in order to investigate the effect of mycorrhizal fungi species on eco-physiological characteristics of *Hyssopus officinalis* L., a factorial experiment based on randomized complete block design was conducted with three replications at the research farm of west Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center in 2012. Treatments were species of mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum*, *G. claroideum*, *Acaulospora longula* and control without mycorrhiza) and four levels of irrigation (irrigation at 80, 70, 60 and 50% field capacity). Results showed the significant effects of irrigation and mycorrhiza on the ascorbate peroxidase, and significant interaction between irrigation and fungi species on the percentage of mycorrhizal colonization, catalase activity and superoxide dismutase. The order of highest colonization of Hyssop root was *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum*, *G. claroideum* and *A. longula* compared to control treatment in all irrigation levels. The highest activity of superoxide dismutase and catalase in plants inoculated with *G. mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. fasciculatum* and *G. claroideum* belonged to irrigation at 50, 60, 50 and 50% of field capacity, respectively. However, the highest ascorbate peroxidase belonged to irrigation at 50% field capacity. In conclusion, the results showed that mycorrhizal species affected the amendment of water deficit stress due to the increased antioxidant enzyme activity in order to neutralize the effects of free radicals and cell membrane stability.

Keywords: ascorbate peroxidase, *Hyssopus officinalis* L., superoxide dismutase, field capacity, catalase.