نقش تنش خشکی و قارچ مایکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در چمن لولیوم چندساله (*Lolium perenne*)

مریم محمدهاشمی[۱]، علی نیکبخت*[۲]، محمد پسرکلی[۳]، نعمت‌اله اعتمادی[۴]

[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*[۲و۴] دانشیاران، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[۳] استاد مدرسه علوم گیاهی، دانشگاه آریزونا، ایالات‌متحده امریکا

*نویسنده مسئول: anikbakht@cc.iut.ac.ir

چکیده

آزمایشی به‌منظور بررسی نقش تنش خشکی و قارچ مایکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در چمن لولیوم چندساله (*Lolium perenne*) اجرا شد. این آزمایش گلدانی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار در طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ در محوطه اطراف گلخانه‌های پژوهشی-آموزشی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. تیمارها شامل تلقیح سه ترکیب قارچ (*Glomus intraradices*، *Glomus mosseae* و مخلوط دو گونه قارچ) و اعمال دو سطح آبیاری (آبیاری کامل و قطع آبیاری) بود. بعد از اتوکلاو خاک و افزودن قارچ‌های مایکوریزا به گلدان‌ها کشت بذرها انجام شد. با استقرار چمن‌ها، تنش خشکی (قطع آبیاری) اعمال گردید. نتایج نشان داد تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردید. هم‌چنین فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان آمیخته با مایکوریزا بیشتر از گیاهان شاهد بود.

***کلمات کلیدی:* آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، خشکی، لولیوم چندساله، مایکوریزا.**

مقدمه

لولیوم چندساله *Lolium perenne L.* یکی از رایج‌ترین گونه‌های چمن فصل سرد است که به دلیل جوانه‌زنی و استقرار سریع معروف می‌باشد (Nikbakht *et al.*, 2012). قارچ مایکوریزا به‌وسیله ایجاد تغییراتی در مورفولوژی، فیزیولوژی، فعالیت های بیوشیمیایی و ساختار مولکولی گیاه توانایی تطبیق دادن گیاهان با شرایط تنش خشکی را داراست (Moradi, 2013).

در شرایط تنش، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن موجب تنش ثانویه اکسیداتیو می‌شود، که این امر منجر به تغییرات یاخته‌ای و انواع آسیب‌ها در گیاه می‌گردد. به‌منظور خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن یک سری از سیستم‌ها در گیاه فعال می‌شود که در میان آن‌ها می‌توان به پراکسیدازها، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز اشاره کرد (Dabrowska *et al.*, 2007). بر همین اساس هدف از این پژوهش بررسی نقش تنش خشکی و قارچ مایکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیدازها، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز در لولیوم چندساله (*Lolium perenne*) بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی نقش تنش خشکی و قارچ مایکوریزا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در لولیوم چندساله (*Lolium perenne*) آزمایشی گلدانی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل تلقیح سه ترکیب قارچ و اعمال دو سطح آبیاری بود.پس از آماده‌سازی مخلوط خاک و ماسه به نسبت ۳:۱، برای اطمینان از عدم وجود میکروارگانیسم‌های دیگر، خاک موردنظر در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و به‌صورت مرطوب اتوکلاو شده و بعد به‌طور کامل با کود مایکوریزا مخلوط شد. بدین‌صورت که گلدان‌های شاهد بدون قارچ در نظر گرفته شدند. سایر تیمارها گونه *G.mosseae*، گونه *G.intraradices* و در نهایت مخلوط هر دو گونه قارچ مورد استفاده قرار گرفت. سپس مخلوط خاک و قارچ در گلدان‌های استریل به ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۱۶ سانتی‌متر که با شن درشت بادامی استریل‌شده به‌عنوان زهکش پوشانده شده بودند، منتقل شد. گلدان‌ها در شرایط مناسب آبیاری قرار گرفتند تا به‌طور کامل سطح گلدان‌ها توسط چمن پوشانده شود. استقرار و پوشاندن کامل سطح گلدان‌ها حدود شش ماه به طول انجامید. سپس اعمال تنش خشکی که به‌صورت قطع آبیاری بود، انجام

شد و آزمایش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیدازها در زمان قبل از تنش خشکی و ۵۰ درصد خشکیدگی چمن صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به روش Sairam و همکاران (۲۰۰۲) صورت پذیرفت. آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی به این صورت انجام شد که ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی در داخل هاون چینی سرد شده با یخ با استفاده از نیتروژن مایع آسیاب گردید و به داخل ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل شده و ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (حاوی ۰/۴۶ میلی‌مول K_2HPO_4، ۰/۴۹ میلی‌مول KH_2PO_4، ۰/۱۹ میلی‌مول EDTA، ۰/۳۸ میلی‌مول Tris-HCl، ۲۰۰ میکرولیتر Triton x100، ۰/۰۰۵ میلی‌مول PVPو ۰/۰۲ میلی‌مول دی‌تیوتریتول) به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند.

سنجش فعالیت آنزیم: به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش(حاوی ۱۲/۴۸ میلی‌مول K_2HPO_4، ۱۲/۴۹ میلی‌مول KH_2PO_4)، ۴/۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرولیتر عصاره نمونه به کوئت اضافه و فعالیت آن در طول موج ۲۴۰ قرائت گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش (طبق توضیح قبل)، ۴/۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن و ۵۰ میکرولیتر عصاره نمونه به کوئت اضافه و فعالیت آن در طول موج ۲۴۰ قرائت گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت پراکسیدازها ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش (طبق توضیح قبل)، ۱۰۰ میکرولیتر استوک آسکوربات، ۴/۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به کوئت اضافه گردید و فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد. محاسبه فعالیت هر سه آنزیم با استفاده از رابطه (۱) انجام پذیرفت :

رابطه (۱) $(\Delta OD \times 1000 \times (1/ A \times EC) \times (B \times C))=$ فعالیت آنزیمی (واحد بر گرم وزن‌تر)

که در این فرمول ΔOD: اختلاف جذب بین قرائت اول و آخر در زمان، A: مقدار عصاره آنزیمی به‌کاررفته برحسب میکرولیتر، EC: ضریب خاموشی مربوط به هر آنزیم، B: مقدار بافر واکنش و C: وزن نمونه گیاهی می‌باشد.

یک واحد آنزیم به‌عنوان میزان لازم برای تجزیه یک میکرومول سوبسترا در یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعریف می‌شود. لازم به ذکر است که ضریب خاموشی آنزیم کاتالاز ۳۹/۴، آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۲/۸ و پراکسیدازها ۲۶/۶ در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل [UV-600 A] - ساخت ژاپن) قرائت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به هر صفت به کمک نرم‌افزار سیستم پردازش آماری Statistix (نسخه۸/۱) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون (LSD)[1]انجام شد. برای انجام محاسبات و رسم نمودارها از نرم افزار اکسل[2] (نسخه ۲۰۱۰) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که فعالیت هر سه آنزیم کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیدازها بسته به اثر تنش خشکی، گونه قارچ مایکوریزا و هم‌چنین بسته به اثر متقابل آن‌ها (در سطح ۰/۱ درصد) تحت‌تأثیر قرار می گیرد(جدول ۱).

[1] Least Significant difference
[2] Excel, version 2010

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر قارچ مایکوریزا بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیدازها
قارچ مایکوریزا	۳	۱۵۳/۲۳**	۰/۱۱**	۴۳۳۴**
تنش خشکی	۱	۲۱۷۸/۵۸**	۴/۱۹**	۲۳۱۶۹۷**
مایکوریزا×خشکی	۳	۷۲/۹**	۰/۰۲*	۲۴۱۹**
خطا	۲۸	۵/۸۲	۰	۳۱۳
کل	۳۹			
ضریب تغییرات		۱۰/۲۹	۱۰/۳۷	۱۴/۴۱

ns عدم وجود اختلاف معنی دار، * اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ** اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ ٪

اثر متقابل داده‌ها نشان داد فعالیت آنزیم‌ها در شرایط تنش خشکی افزایش یافته و آمیختن چمن با قارچ مایکوریزا در شرایط خشکی نیز مؤثر بوده است. تنش خشکی در شرایط استفاده از *G.intraradices* باعث ۲، ۳ و ۴/۵ برابر شدن فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیدازها نسبت به آبیاری کامل شد (جدول۳).

جدول۲- مقایسه میانگین اثر ساده قارچ مایکوریزا و تنش خشکی

تیمار	فعالیت آنزیم کاتالاز (واحد بر گرم وزن تر)	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر)	فعالیت پراکسیدازها (واحد بر گرم وزن تر)
M0	۱۹/۱۷ c	۰/۵۱ c	۱۰۵/۳۶ b
M1	۲۸/۶۵ a	۰/۷۶ a	۱۴۷/۸۳ a
M2	۲۳/۲۴ b	۰/۵۸ b	۱۰۵/۷۶ b
M3	۲۲/۷۳ b	۰/۶۱ b	۱۳۱/۷ a
LSD	۱/۰۸	۰/۰۲	۷/۹۱
خشکی			
S0	۱۶/۰۷ b	۰/۲۹ b	۴۶/۵۵ b
S1	۳۰/۸۳ a	۰/۹۳ a	۱۹۸/۷۷ a
LSD	۰/۷۶	۰/۰۲	۵/۵۹

در هر ستون و برای هر واحد آزمایشی میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون LSDدر سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.M0: بدون تلقیح قارچ، M1:*G. intraradices*، M2:*G. mosseae*، M3: مخلوط دو گونه قارچ
S0: بدون تنش خشکی، S1: تنش خشکی با قطع آبیاری

جدول۳- اثر متقابل قارچ مایکوریزا و تنش خشکی

تیمار	فعالیت آنزیم کاتالاز(واحد بر گرم وزن تر)	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(واحد بر گرم وزن تر)	فعالیت پراکسیدازها(واحد بر گرم وزن تر)
S0M0	۱۵/۱۲ d	۰/۲۲ f	۳۷/۸۴ d
S0M1	۱۷/۹۹ d	۰/۳۸ d	۵۳/۰۸ d
S0M2	۱۵/۸۵ d	۰/۲۵ ef	۴۵/۹۵ d
S0M3	۱۵/۳۱ d	۰/۳۲ de	۴۹/۳۵ d
S1M0	۲۳/۲۱ c	۰/۸۱ c	۱۷۲/۸۸ c
S1M1	۳۹/۳۱ a	۱/۱۴ a	۲۴۲/۵۸ a
S1M2	۳۰/۶۳ b	۰/۹ b	۱۶۵/۵۷ c
S1M3	۳۰/۱۵ b	۰/۰۹ b	۲۱۴/۰۵ b
LSD	۱/۵۳	۰/۰۴	۱۱/۱۸

در هر ستون و برای هر واحد آزمایشی میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون LSDدر سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.M0: بدون تلقیح قارچ، M1:*G. intraradices*، M2:*G. mosseae*، M3: مخلوط دو گونه قارچ S0: بدون تنش خشکی، S1: تنش خشکی با قطع آبیاری

منابع

Dabrowska, G., Kate, A., Goc, A., Hebda, M. S. and Skrzypek, E. 2007. Charicteristics of the plant ascorbate peroxidise family. Acta Biology Cracoviensia Series Botanica, 49: 7-17.

Moradi, S. and Salami, S. 2013. Effects of AM Fungi on shoot traits of *Lolium perrene* in drought stress condition. Agron. J. 4:265-270.

Nikbakht, A., Kiani, A. and Etemadi, N. 2012. Principles of Turfgrass Management (Translation). Industial University of Technology.

Sairam, R. K., Eerabhadra, K. V. and Sirvastava, G. C. 2002. Differential response of wheat Genotypes to Long term Slinity stress in Relation to Oxidative stress, Antioxidant Activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163: 1037-1064.

The Role of Drought Stress and Mycorrhizal Inoculation on Antioxidant Enzymes of Perennial Ryegrass (*Lolium perrene*)

Maryam Mohamad-Hashemi [1], Ali Nikbakht*[1], Mohamad Pessarakli [2], Nematolah Etemedi [1]

[1] Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[2] School of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences University of Arizona, USA
*Corresponding Author: anikbakht@cc.iut.ac.ir

Abstract

In order to evaluate the role of drought stress and mycorrhizal inoculation on antioxidant enzymes of Perennial Ryegrass (*Lolium perrene*) a pot survey was conducted at Isfahan University of Technology, Iran. The soil was mixed with mycorrhizal fungi. The experiment was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized design with 5 replications during the years 2013-2014. The **treatments included 3 mycorrhizal fungi and 2 irrigation conditions. After autoclaving the soil and adding mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices, Glomus mosseae* or a mixture of two species of fungi) seeds were planted in pots. After the establishment of grasses, drought stress (no irrigation) were applied on related pots. The results showed that drought stress increased antioxidant enzymes, Also Myco remediation increased anti-oxidant enzyme activity too.**

***Keywords*: Mycorrhizal fungi, dry stress, Perennial Ryegrass, antioxidant enzymes.**