اثر قارچ‌ریشه بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دانهال بِه در شرایط کمبود آهن

ساره رحیمی*[۱]، بهرام بانی‌نسب[۱]، مجید طالبی[۲]، مهدیه غلامی[۱]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
*نویسنده مسئول: sareh.rahimi@ag.iut.ac.ir

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دانهال‌های بِه رقم اصفهان تلقیح‌شده با دو گونه قارچ‌ریشه و سطوح مختلف آهن انجام گرفت. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و فاکتورها شامل سه سطح قارچ‌ریشه (عدم تلقیح، *Rhizophagus intraradices* و *Funneliformis mosseae*) و دو سطح آهن (۵ و ۵۰ میکرومولار) بود. بستر کاشت مخلوطی از شن کوارتز و پرلیت استریل شده بود. مایه تلقیح قارچ‌ریشه در زمان کاشت بذر در فاصله دو الی سه سانتی‌متری زیر بذرها قرار داده شد. چهار ماه پس از تلقیح تیمارکمبود آهن (۵ میکرومولار) شروع شد و ۹۰ روز پس از آن نمونه‌های گیاهی برای اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در شرایط کمبود آهن دانهال‌های بِه تلقیح شده با قارچ‌ریشه‌ها در مقایسه با تیمار شاهد به صورت معنی‌داری غلظت پراکسید هیدروژن کم‌تری داشتند. کاربرد *R. intraradices* در مقایسه با تیمار عدم تلقیح نیز در این شرایط سبب افزایش ۱/۹ و ۱/۷ برابری در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز شد. افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز در هر دو تیمار قارچی در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با توجه به نقش آهن در تعدیل فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان می‌توان نتیجه‌گیری نمود که قارچ‌ریشه‌ها در شرایط کمبود آهن احتمالاً با اثر بر افزایش جذب آهن نقش مهمی در بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دانهال بِه داشتند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آهن، پراکسید هیدروژن، *Rhizophagus intraradices*، *Funneliformis mosseae*

مقدمه

یکی از مهم‌ترین وظایف شناخته‌شده‌ی آهن مشارکت در سیستم‌های آنزیمی است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهی مشارکت دارند. از آنجا که آهن جزء ضروری زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری می‌باشد بنابراین کمبود آهن با اختلال در زنجیره انتقال الکترون و تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Donnini *et al*., 2011). گیاهان به منظور کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش اکسیداتیو از مکانیسم‌های حفاظتی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز بهره می‌گیرند (Jelali *et al*., 2014). آهن نقش مهمی در زدودن گونه‌های اکسیژن فعال دارد زیرا آهن جزء ساختمانی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و یا کوفاکتور آن‌ها می‌باشد بنابراین در شرایط کمبود آهن فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد (Santos *et al*., 2019). بِه از جمله درختان حساس به شرایط کمبود آهن است و در چنین شرایطی به صورت قابل توجهی افزایش در تجمع گونه‌های اکسیژن فعال را نشان می‌دهد (Valipour *et al*., 2020). امروزه استفاده از کودهای زیستی جهت تأمین عناصر معدنی مورد نیاز گیاه به عنوان یک تکنولوژی نوین برای تغذیه گیاه رو به افزایش است. زمانی که گیاه از کمبود آهن رنج می‌برد میکروارگانیسم‌های ریزوسفری ترکیبات آلی با وزن مولکولی پایین مانند سیدروفورها، اسیدهای آلی و نیز پروتون به محیط ریزوسفر ترشح می‌کنند که موجب افزایش دسترسی آهن توسط ریشه‌های گیاه و بهبود فعالیت سیستم‌های آنزیمی می‌گردد. بطور کلی تأثیر مثبت همزیستی قارچ‌ریشه بر گیاه در شرایط تنش ناشی از بهبود تغذیه معدنی و نیز تغییر در فعالیت سیستم‌های آنزیمی عنوان شده است (Jin *et al*., 2014). اطلاعات اندکی در رابطه با نقش قارچ‌ریشه‌ها در جذب ریزمغذی‌هایی مانند آهن و اثر بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان در دسترس است. از این رو مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر قارچ‌ریشه‌ها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانهال‌های بِه رقم اصفهان در شرایط کمبود آهن انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر بر روی دانهال‌های بِه رقم اصفهان در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی اصفهان و به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل کاربرد دو گونه قارچ‌ریشه *Rhizophagus intraradices* و *Funneliformis mosseae* و فاکتور دوم دربرگیرنده‌ی تیمار آهن (Fe-EDDHA) در دو سطح ۵ و ۵۰ میکرومولار بود. بذرهای جوانه‌زده بِه در گلدان‌های پلاستیکی با حجم چهار لیتر حاوی محیط کشت شن و پرلیت (به نسبت حجمی ۱ به ۱) استریل شده کشت شدند. قبل از کاشت بذرها، ۱۴۰ گرم مایه‌ی تلقیح (هر گرم حاوی ۱۰ اسپور) در فاصله‌ی ۳-۲ سانتی‌متری زیر بذرها قرار گرفت. از زمان کاشت بذرها تا استقرار کامل دانهال‌ها و شروع تیمارهای آهن، تمامی گلدان‌ها ۲ مرتبه در طول هفته (به مدت ۳ ماه) با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (pH ۶±۰/۱) تغذیه شدند. سه ماه پس از کاشت بذرها تیمار آهن با دو سطح ۵ میکرومولار (شرایط کمبود) و ۵۰ میکرومولار (حد بهینه) اعمال شد و با مشاهده علائم کمبود آهن در برگ‌ها نمونه‌گیری از برگ‌ها جهت اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن طبق روش سرجیف و همکاران (۱۹۹۷) ۰/۱ گرم نمونه برگ تازه درون هاون چینی همراه با نیتروژن مایع و در حضور یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سرد عصاره‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی سانتریفیوژ شده به ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم‌فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH ۷) و دو میلی‌لیتر معرف یدید پتاسیم یک مولار افزوده شد. میزان جذب ترکیب حاصل پس از یک ساعت قرارگیری در تاریکی در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت غلظت پراکسید هیدروژن با استفاده از معادله خط بدست آمده محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به کمک روش جیانوپولیتیس و ریئس (۱۹۷۷) صورت گرفت. فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش ناکانو و آسادا (۱۹۸۱) با اندازه‌گیری کاهش جذب (به دلیل پراکسیداسیون اسید آسکوربیک) در طول موج ۲۹۰ نانومتر طی مدت زمان دو دقیقه و به روش اسپکتروفتومتری محاسبه شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز عصاره‌های استخراج شده نیز توسط روش مائلی و چنس (۱۹۵۴) و با استفاده از گایاکول به عنوان دهنده الکترون اندازه‌گیری شد.

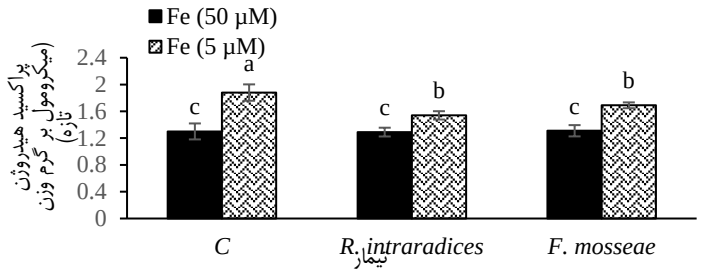
نتایج و بحث

غلظت پراکسید هیدروژن برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمار قارچ‌ریشه، غلظت آهن محلول غذایی و نیز اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری بر غلظت پراکسید هیدروژن برگ دانهال بِه داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای قارچ‌ریشه و سطوح آهن نشان داد هر چند در شرایط غلظت بهینه آهن (۵۰ میکرومولار) کاربرد تیمارهای قارچ‌ریشه تأثیری بر غلظت پراکسید هیدروژن برگ نداشت اما در شرایط کمبود آهن (۵ میکرومولار) کاربرد هر دو گونه قارچ‌ریشه به‌طور معنی‌داری پراکسید هیدروژن را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد (شکل ۱). از آنجا که آهن جزء ضروری زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری می‌باشد بنابراین کمبود آهن با اختلال در زنجیره انتقال الکترون، تولید گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش داده و منجر به تجمع پراکسید هیدروژن در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود (Donnini *et al*., 2011). در پژوهش حاضر کاهش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در تیمارهای قارچ‌ریشه را می‌توان به نقش احتمالی این ریزموجودات در جذب بهتر آهن در شرایط کمبود نسبت داد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر آهن و تیمارهای قارچریشه بر صفات آنتی‌اکسیدانی برگ دانهال بِه

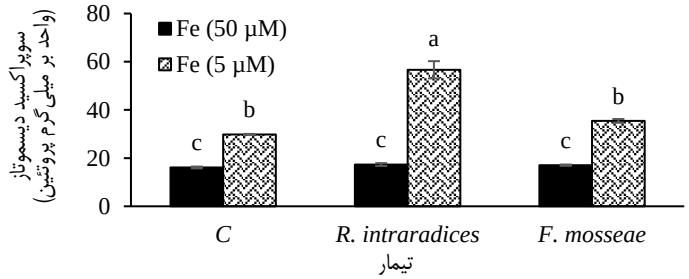
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		پراکسید هیدروژن	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز
قارچریشه	۲	۰/۰۴۵۶*	۳۲۲/۷۸***	۰/۲۰۲۱**	۲/۳۰**
آهن	۱	۰/۷۳۱۲***	۲۵۴۹/۱۹***	۶/۲۰***	۳۹/۷۱***
قارچریشه×آهن	۲	۰/۰۳۸۵*	۲۷۸/۵۷**	۰/۱۱۷۲*	۸/۷۷*
خطای آزمایش	۱۲	۰/۰۰۹۵	۱۰/۵۵	۰/۰۲۴۲	۰/۱۴۷۸
ضریب تغییرات		۶/۵	۱۱/۳	۸/۹	۸/۴



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار قارچریشه و غلظت آهن محلول غذایی بر غلظت پراکسید هیدروژن برگ دانهال بِه. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشد. C: شاهد (عدم تلقیح)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

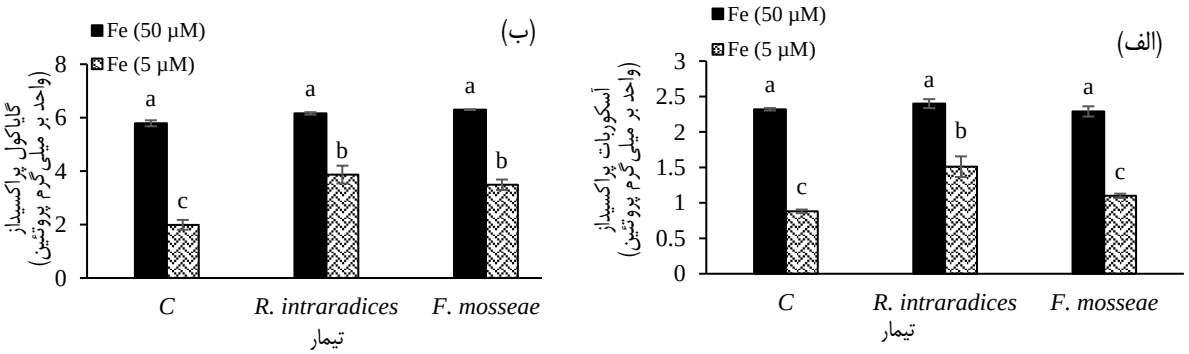
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمار قارچریشه، غلظت آهن محلول غذایی و نیز اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ دانهال بِه داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای قارچریشه و سطوح آهن نشان داد در شرایط بهینه آهن تیمارهای قارچریشه از لحاظ آماری اثر معنی‌داری بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نداشتند. این در حالی است که با کاهش غلظت آهن محلول غذایی کاربرد قارچریشه *R. intraradices* سبب افزایش ۱/۹ برابری فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شد (شکل ۲). سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل کرده و به عنوان اولین خط دفاعی گیاه در برابر گونه‌های اکسیژن فعال شناخته شده است (Santos *et al*., 2019). افزایش فعالیت این آنزیم به دلیل افزایش تجمع رادیکال‌های سوپراکسید در شرایط کمبود آهن و ضرورت حذف آن‌ها جهت حفاظت گیاه از آسیب اکسیداتیو می باشد. مشابه با نتایج پژوهش حاضر گزارش شده است که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان آفتابگردان تلقیح شده با قارچریشه *R. intraradices* در شرایط کمبود آهن در مقایسه با گیاهان تلقیح‌نشده بیش‌تر بود که نشان‌دهنده القاء فعالیت این آنزیم در ارتباط با قارچریشه می‌باشد (Kabir *et al*., 2015).



شکل ۲-مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار قارچ‌ریشه و غلظت آهن محلول غذایی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ دانهال بِه. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشد. C: شاهد (عدم تلقیح)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمار قارچ‌ریشه، غلظت آهن محلول غذایی و نیز اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و نیز گایاکول پراکسیداز برگ دانهال بِه داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد هیچ یک از تیمارها در شرایط بهینه آهن اثر معنی‌داری بر فعالیت این دو آنزیم نداشتند. در شرایط کمبود آهن کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در تمامی تیمارها مشاهده شد در حالی‌که افزایش معنی‌داری در فعالیت آسکوربات پراکسیداز با کاربرد قارچ‌ریشه *R. intraradices* و نیز گایاکول پراکسیداز با کاربرد دو گونه قارچ‌ریشه نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۳ الف و ب). آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز بخش مهمی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌شمار می‌روند که در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن نقش دارند (Santos *et al*., 2019). آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز آنزیم‌های حاوی گروه هیم هستند. بنابراین دلیل احتمالی کاهش فعالیت آن‌ها می‌تواند کمبود آهن جهت فعالیت آن‌ها و یا حساسیت گونه گیاهی به کمبود آهن باشد، چرا که مشاهده شده است گونه‌های متحمل در شرایط کمبود آهن فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز را افزایش می‌دهند (Donnini *et al*., 2011). در این تحقیق علیرغم اینکه در کلیه تیمارها فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در شرایط کمبود آهن نسبت به شرایط بهینه کاهش یافت اما نتایج نشان داد میزان فعالیت این آنزیم‌ها عموماً در تیمارهای قارچی بیش‌تر از تیمار شاهد بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به وضعیت تغذیه‌ای ناشی از تلقیح گیاهان ذرت با قارچ‌ریشه *R. intraradices* در مقایسه با شاهد نسبت داده شده است (Balakrishnan *et al*., 2017). بنابراین بهبود توانایی گیاهان در جذب آهن در شرایطی که دسترسی گیاه به آهن محدود است می‌تواند با بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و حذف گونه‌های اکسیژن نقش بسزایی در تقلیل آسیب اکسیداتیو داشته باشد.



شکل ۳-مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار قارچ‌ریشه و غلظت آهن محلول غذایی بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (الف) و گایاکول پراکسیداز (ب) برگ دانهال بِه. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشد. C: شاهد (عدم تلقیح)

منابع

Balakrishnan, N., Subramanian, K.S. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungus inoculation on antioxidant enzyme activities in maize plants at different levels of Fe and Zn fertilization. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6: 1754–1768.

Donnini, S., Dell'Orto, M., Zocchi, G. 2011. Oxidative stress responses and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotypes. Tree Physiology, 31: 102–113.

Giannopolitis, C.,Ries, S. 1977. Superoxide dismutases. Plant Physiology, 59: 315–318.

Jelali, N., Bonnini, S., Dell'Orto, M., Abdelly, C., Gharsalli, M., Zocchi, G. 2014. Root antioxidant responses of two *Pisum sativum* cultivars to direct and induced Fe deficiency. Plant Biology, 16: 607–614.

Jin, C.W., Ye, Y.Q., Zheng, S. J. 2014. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. Annals of Botany, 113: 7–18.

Kabir, A.H., Rahman, M.M., Haider, S.A., Paul, N.K. 2015. Mechanisms associated with differential tolerance to Fe deficiency in okra (*Abelmoschus esculentus* Moench). Environmental and Experimental Botany, 112: 16–26.

Maehly, A., Chance, B. 1954. The assay of catalse and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis, 1: 358–423.

Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22: 867–880.

Santos, C.S., Ozgur, R., Uzilday, B., Turkan, I., Roriz, M., Rangel, A.O.S.S., Carvalho, S.M.P., Vasconcelos, M.W. 2019. Understanding the role of the antioxidant system and the tetrapyrrole cycle in iron deficiency chlorosis. Plants, 8: 348.

Sergiev, I., Alexieva, V., Karanov, E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 51: 121–124.

Valipour, M., Baninasab, B., Khoshgoftarmanesh, A.H., Gholami, M. 2020. Oxidative stress and antioxidant responses to direct and bicarbonate-induced iron deficiency in two quince rootstocks. Scientia Horticulturae, 261: 108933.

The effect of mycorrhizal on the antioxidant enzymes activity in quince seedling under iron deficiency conditions

Sareh Rahimi[1*], Bahram Baninasab[1], Majid Talebi[2], Mahdiyeh Gholami[1]
[1]Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[2]Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[*]*Corresponding Author*: sareh.rahimi@ag.iut.ac.ir

Abstract

The present study was performed with the factorial arrangement in a completely randomized design to investigate the changes in antioxidant enzyme activities in quince seedlings cv. Isfahan inoculated with two species of mycorrhizal and different levels of Fe. The factors consisted of three levels of mycorrhizal (without inoculation, *Rhizophagus intraradices* and *Funneliformis mosseae*) and two iron levels (5 and 50 µM). The substrate was sterilized quartz sand and perlite mixture. The inoculums of mycorrhizal were incorporated into the media by placing them at a depth of 2-3 cm below the seeds. Four months after inoculation, iron deficiency treatment (5 µM) was started and 90 days later, plant samples were tested for hydrogen peroxide, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase. The results showed that under Fe-deficiency quince seedlings treated with mycorrhizal had a significantly lower hydrogen peroxide concentration than that of non-inoculated plants. Also, under these conditions, *R. intraradices* led to a 1.9 and 1.7 fold enhancement in the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in comparison with non-treated plants. Guaiacol peroxidase enzyme activity increased in both the mycorrhizal treatments compared with the control. Due to the role of iron in modulating the activity of the plants antioxidant system, it can be concluded that under Fe-deficiency conditions mycorrhizal may have played an important role in improving the activity of antioxidant enzymes by increasing the absorption of iron in the quince seedlings.

***Keywords*:** Antioxidant enzymes, Hydrogen peroxide, Iron, *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae*