مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۴۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲ (ص۲۲۰-۲۱۳)

اثر گلوموس موسه و تنش کم‌آبی بر رشد و تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشهٔ مرکبات

مهدی زارعی[1]*، زهرا پیمانه[2]

۱. استادیار بخش علوم خاک دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه شیراز

۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بخش علوم خاک دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۵ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۵/۹)

چکیده

آزمایشی گلخانه‌ای، به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی، به‌منظور بررسی اثر قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر رشد و تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشهٔ گیاهان رافلمون و نارنج انجام شد. فاکتورهای استفاده‌شده شامل قارچ میکوریز آربسکولار در دو سطح، شامل قارچ گلوموس موسه و شاهد بدون قارچ، و تنش کم‌آبی در چهار سطح، شامل دورهای آبیاری ۲ و ۴ و ۶ و ۸ روز، بود. با افزایش تنش کم‌آبی، عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه کاهش یافت و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز در ریشه بیشتر شد. در هر دو پایه عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز ریشه در تیمارهای دارای قارچ نسبت به تیمارهای بدون قارچ، در هر دو شرایط بدون تنش و با تنش کم‌آبی، بیشتر بود. در تیمارهای قارچی با افزایش تنش کم‌آبی درصد کلنیزاسیون ریشه (تا چهل درصد) کاهش یافت.

کلیدواژگان: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ریشهٔ مرکبات، قارچ میکوریز آربسکولار، کم‌آبی.

مقدمه

موجودات زنده در معرض انواع تنش‌ها قرار می‌گیرند که ممکن است حاصل فعالیت‌های بشر یا عوامل طبیعی باشد؛ مانند خشکی، درجهٔ حرارت بالا، شدت نور، محدودیت‌های تغذیه‌ای، و غیره. از آنجا که مکانیسم گیاهان در برابر تنش‌ها محدود می‌شود، باید انعطاف‌پذیر باشند تا بتوانند خود را با تغییر شرایط محیطی انطباق دهند. از ویژگی‌های معمول گیاهان افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌ها هنگام مواجه‌شدن با تنش است؛ هرچند گونه‌های اکسیژن طی فرایندهای طبیعی سوخت‌وساز سلول‌ها نیز تولید می‌شوند (Alscher *et al*, 1997). در گیاهان انرژی بالای واکنش‌های متابولیکی و فراوانی اکسیژن کلروپلاست، میتوکندری، و پراکسی‌زوم‌ها را به مکان‌های غنی از اکسیژن‌های فعال، شامل اکسیژن‌های منفرد و سوپراکسید، تبدیل می‌کند (Asada, 1994; Bennoun, 1994). تنش اکسیداتیو فرایندی کنترل‌شده است که تعادل گونه‌های فعال اکسیژن و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سرنوشت گیاه را مشخص می‌کند. در شرایط بدون تنش، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه نقش خنثی‌کردن اکسیژن‌های فعال و نگه‌داشتن آن در سطح پایین خسارت‌زایی را فراهم می‌کند. تنش‌های طبیعی و دست‌ساز بشر موجب افزایش تولید اکسیژن‌های سمی و مشتقات آن می‌شود. در پاسخ، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه افزایش پیدا می‌کند؛ اما در بیشتر موارد پاسخ در حد متوسط است. برخی مکان‌ها نیز در برابر آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت کمی دارند (Asada and Takahashi, 1987). رادیکال‌های سوپراکسید با احیای ملکول‌های اکسیژن در اثر تنش‌های مختلف در گیاه تولید می‌شوند و به‌سرعت به‌وسیلهٔ آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شوند. پراکسید هیدروژن تولیدشده به‌وسیلهٔ کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مهار می‌شود (Ajay *et al*, 2002).

تنش کم‌آبی یکی از تنش‌های محیطی کشور ایران است که خشک‌سالی‌های اخیر بر شدت آن افزوده است. Alcamo *et al* (2000) به این نتیجه رسیدند که بر اساس نسبت بحرانی‌شدن، یعنی میزان برداشت به میزان دسترسی به آب، ایران نسبت بحرانی بیشتر از ۰/۸ خواهد داشت و در سال ۲۰۲۵ در گروه کشورهای دچار تنش کم‌آبی شدید قرار خواهد گرفت. Smakthin *et al* (2004)، که تنش کم‌آبی را به‌صورت استفادهٔ انسان از منابع آب تجدیدپذیر، بعد از کسر نیازهای زیست‌محیطی از کل منابع آب، تعریف می‌کنند، ایران را کشوری با تنش کم‌آبی زیاد معرفی می‌کنند. در ایران در سال ۱۳۸۹ سطح زیر کشت مرکبات در حدود ۲۹۰ هزار هکتار بود که در رتبهٔ هشتم جهانی قرار داشت. مازندران، فارس، هرمزگان، جیرفت، و کهنوج نسبت به سایر مناطق ایران از لحاظ سطح زیر

* نویسنده مسئول: Mehdizarei@shirazu.ac.ir

کشت و میزان تولید، به‌ترتیب، اهمیت و امتیاز بیشتری دارند (Jihouni *et al*, 2012). برای تداوم کشت و تولید در شرایط تنش کم‌آبی به‌کارگیری روش‌های نوین، از جمله استفاده از کودهای زیستی، ضروری می‌نماید.

میکوریز آربسکولار، که کودی زیستی است، در سیستم‌های زراعی و باغی ارزش‌های اقتصادی و اکولوژیک فراوان دارد. قارچ‌های میکوریز آربسکولار با ریشهٔ اکثر گیاهان، به‌خصوص مرکبات، هم‌زیستی ایجاد می‌کنند و تأثیری گسترده بر رشد گیاهان میزبان دارند. آن‌ها قادرند با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی اثرات نامطلوب تنش کم‌آبی را در گیاهان تعدیل کنند (Auge, 2001; Wu *et al*, 2007). گیاهان مرکبات با قارچ‌های میکوریز آربسکولار هم‌زیستی برقرار می‌کنند. Zanganeh *et al* (2002) در تحقیقی بیست و سه گونه قارچ میکوریز آربسکولار را در ریزوسفر مرکبات ایران شناسایی کردند. قارچ میکوریز آربسکولار رشد دانهال‌های نارنج سه‌برگ را در شرایط آب مناسب و تنش کم‌آبی نسبت به گیاهان بدون قارچ افزایش داده است (Wu *et al*, 2005). Wu *et al* (2007) در بررسی تأثیر گونه‌های قارچ گلوموس بر میزان پروتئین قابل حل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، و گایاکول پراکسیداز در برگ دانهال‌های نارنگی در شرایط تنش کم‌آبی نشان دادند که در برگ دانهال‌های نارنگی تلقیح‌شده با قارچ‌های گلوموس موسه و گلوموس ورسیفرم در شرایط تنش کم‌آبی افزایش معناداری فقط در فعالیت کاتالاز مشاهده می‌شود. بیشترین غلظت پروتئین قابل حل در برگ نهال‌های تلقیح‌شده با قارچ گلوموس موسه، بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در برگ دانهال‌های تلقیح‌شده با قارچ گلوموس دیافانوم، و بیشترین فعالیت گایاکول پراکسیداز در برگ دانهال‌های تلقیح‌شده با قارچ گلوموس ورسیفرم به‌دست آمد. در این تحقیق مشخص شد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ گیاهان میکوریزی بالاتر است و آسیب‌های سلولی با کلنیزه‌شدن ریشه‌ها کاهش می‌یابد. Haghighatnia *et al* (2011) نشان دادند کلنی‌سازی میکوریزی پایهٔ مرکبات ولکامرانیا، به‌ویژه تلقیح گیاه با گونهٔ گلوموس اینترارادیسز، به‌واسطهٔ تأثیر مثبت بر پارامترهای مورفولوژیک، جذب عناصر غذایی (پتاسیم، فسفر، کلسیم)، مقدار کلروفیل، و رطوبت نسبی آب برگ در شرایط تنش کم‌آبی سبب اصلاح مقاومت به تنش کم‌آبی در گیاه می‌شود. با توجه به اهمیت قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر افزایش مقاومت به خشکی مرکبات و اینکه در ارتباط با نقش این قارچ‌ها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان پایهٔ مرکبات بومی کشور، به‌خصوص ریشه‌ها، اطلاعاتی وجود نداشت، این مطالعه با هدف بررسی اثر قارچ گلوموس موسه بر مقاومت به خشکی دو پایهٔ مرکبات بومی از طریق تأثیر بر رشد گیاه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه انجام شد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های تازهٔ نارنج از موزهٔ نارنجستان شیراز و رافلمون از مرکز تحقیقات کشاورزی داراب تهیه شد. میوه‌های تازه با آب شسته و با محلول وایتکس دارای هیپو کلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی و خشک شد. سپس، بذرهای آن‌ها بیرون آورده شد و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و ضد عفونی سطحی و سپس چندین مرتبه با آب مقطر شسته شد (Wu *et al*, 2007). گلدان‌های پلاستیکی حاوی بستری با نسبت حجمی ۱:۱:۱ از مخلوط سترون‌شده (اتوکلاوشده) خاک‌برگ و ماسهٔ بادی و خاک آماده شد. سه عدد از بذرهای خشک‌شده در هر گلدان کاشته شد. گلدان‌ها به‌طور روزانه آبیاری و به مدت سه ماه نگه‌داری شدند. در پایان این دوره دانهال‌های یکسان و هم‌اندازهٔ به‌دست‌آمده به کشت اصلی منتقل شد.

خاک به مقدار مورد نیاز کشت اصلی از افق سطحی (صفر تا ۲۰ سانتی‌متری) از سری دانشکده با نام علمی Cambisols Calcic (در سیستم طبقه‌بندی فائو) و mixed, mesic, Fine, calcixerollic, Xerochrept (در طبقه‌بندی امریکایی) برداشت و سترون شد. خاک بر اساس روش‌های استاندارد تجزیه گردید. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول ۱ می‌آید. برای اعمال تیمارهای کم‌آبی، گلدان‌های محتوی ۵ کیلوگرم خاک انتخاب و مقدار رطوبت آن‌ها به حد ظرفیت زراعی، که مقادیر ظرفیت زراعی و پژمردگی دائم قبلاً با صفحهٔ فشاری اندازه‌گیری شده بود، رسانده شد. سپس روزانه در ساعت مشخصی وزن کل خاک مرطوب اندازه‌گیری گردید و تا زمان رسیدن به نقطهٔ پژمردگی دائم (حدود ۱۵ روز) وزن کردن آن‌ها ادامه یافت. مقدار کاهش رطوبت در هر روز با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد (Sepaskhah and Yarami, 2009):

$$\frac{\Theta_{FC} - \Theta_{specific\ day}}{\Theta_{FC} - \Theta_{pwp}}$$

سپس منحنی رطوبتی با استفاده از مقادیر به‌دست‌آمدهٔ رطوبت طی ۱۵ روز رسم گردید و با استفاده از این نمودار دورهای آبیاری ۲ و ۴ و ۶ و ۸ روز مشخص شد. در هر دور آبیاری با وزن‌کردن رطوبت خاک به حد ظرفیت مزرعه می‌رسید (Sepaskhah and Yarami, 2009). آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی، با سه تکرار در شرایط گلخانه،

انجام شد. فاکتورهای استفاده‌شده در آزمایش شامل قارچ میکوریز آربسکولار در دو سطح، شامل گلوموس موسه و شاهد، تنش کم‌آبی در چهار سطح، شامل دورهای آبیاری ۲ و ۴ و ۶ و ۸ روز، و دو پایهٔ نارنج و رافلمون بود. گلدان‌های بدون زهکش انتخاب و با الکل، سترون سطحی انجام شد. به هر گلدان ۵ کیلوگرم خاک افزوده گردید. بر اساس آزمون خاک، عناصر مورد نیاز به خاک اضافه شد. دو عدد دانهال‌ها به هر گلدان انتقال یافت. مایهٔ تلقیح قارچ از بخش علوم خاک دانشگاه شیراز تهیه و به روش تله تکثیر گردید. برای تلقیح قارچ میکوریز آربسکولار مقدار ۷۰ گرم مایهٔ تلقیح قارچ گلوموس موسه شامل اسپور (۱۰ اسپور در هر گرم بستر) و هیف و قطعات کلنیزه‌شده (۸۰٪) و کلنیزه‌نشدهٔ ریشه‌ای و بستر در ۵ سانتی‌متری خاک گلدان و کنار ریشهٔ دانهال‌ها قرار داده شد. به‌منظور حفظ جمعیت میکروبی، غیر از قارچ میکوریز و یکسان‌شدن وزن گلدان‌ها، مقدار ۷۰ گرم از بستر گلدان‌های شاهد تلقیح‌نشده با قارچ، که در مرحلهٔ کشت تله نگه‌داری شده بودند، به تیمارهای بدون قارچ در کشت اصلی اضافه گردید. بعد از گذشت یک ماه از کشت اصلی (تلقیح قارچ‌ها) تیمارهای تنش کم‌آبی اعمال گردید (Haghighatnia *et al*, 2011). بعد از گذشت شش ماه از کشت اصلی، برداشت گیاهان صورت گرفت. مقداری از ریشه‌ها (۰/۵ گرم) نمونه‌برداری و برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه در محلول فرمالدئید- اسید استیک- الکل نگه‌داری گردید (Wu *et al*, 2007). رنگ‌آمیزی ریشه به روش Kormanik and McGraw(1982) انجام شد و به روش خطوط متقاطع درصد کلنیزاسیون ریشه تعیین گردید. اندام‌های گیاه، شامل اندام هوایی و ریشه، با آب مقطر شسته شد و در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد، تا زمانی که وزن خشک آن‌ها ثابت شود، قرار گرفت. سپس وزن خشک اندام هوایی و ریشه محاسبه گردید. مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های ریشهٔ هر تیمار جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز نمونه‌برداری شد. نمونه‌های ریشه در نیتروژن مایع منجمد و در فویل آلمینیومی قرار داده شد و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، ابتدا نمونه‌های ریشه در حضور نیتروژن مایع با کمک هاون چینی کاملاً آسیاب شد. سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج دارای پلی وینیل پیرولیدون به آن اضافه و داخل هاون چینی کاملاً هموژنیزه شد. مخلوط حاصل در لولهٔ اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و پس از آن فاز بالایی جهت تعیین فعالیت آنزیم‌ها جدا گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز از روش Nakano and Asada (1981)، آنزیم کاتالاز از روش Dhindsa *et al* (1981)، و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Beauchamp and Fridovich (1971) استفاده شد و واحد فعالیت آن‌ها به صورت $U\ g^{-1}$ وزن تازهٔ ریشه تعیین گردید (Wu *et al*, 2006). تجزیهٔ آماری و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون LSD با کمک نرم‌افزار آماری SAS انجام و نمودارها با Excel رسم گردید.

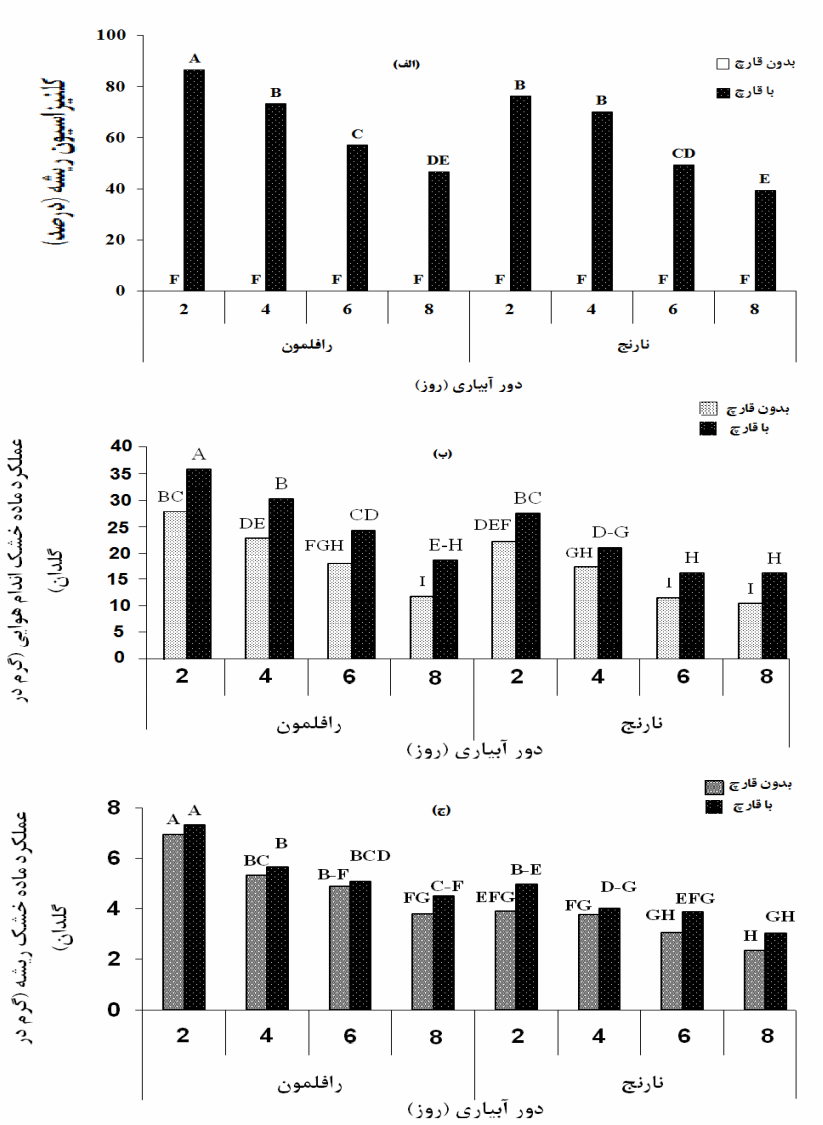
جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک استفاده‌شده در تحقیق

خصوصیات خاک (واحد)		خصوصیات خاک (واحد)	
بافت	لوم رسی شنی	مادهٔ آلی (درصد)	۰/۹۳
رطوبت ظرفیت مزرعه (٪)	۲۳/۷	ظرفیت تبادل کاتیونی ($cmol_+\ kg^{-1}$)	۲۴
رطوبت نقطهٔ پژمردگی دائم (٪)	۹/۸۳	فسفر محلول در بی‌کربنات سدیم ($mg\ kg^{-1}$)	۹
پ‌هاش	۷/۹۶	مس قابل استخراج با دی.تی.پی.ا ($mg\ kg^{-1}$)	۱/۵۰
قابلیت هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	۰/۳۳	آهن قابل استخراج با دی.تی.پی.ا ($mg\ kg^{-1}$)	۲/۶۶
روی قابل استخراج با دی.تی.پی.ا ($mg\ kg^{-1}$)	۰/۹۷	منگنز قابل استخراج با دی.تی.پی.ا ($mg\ kg^{-1}$)	۴/۳۰

یافته‌ها و بحث

بر اساس جدول تجزیهٔ واریانس (جدول ۲) اثر تنش کم‌آبی و قارچ و پایه بر کلنیزاسیون ریشه و عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز ریشه معنادار است. همچنین برهمکنش تنش کم‌آبی و قارچ بر کلنیزاسیون ریشه و فعالیت آنزیم کاتالاز و برهمکنش تنش کم‌آبی و پایه بر عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و برهمکنش پایه و قارچ بر کلنیزاسیون ریشه معنادار است. هیچ‌گونه اندام قارچی در تیمارهای تلقیح‌نشده با قارچ میکوریز مشاهده نشد. ولی در تیمارهای تلقیح‌شده قارچ گلوموس موسه ریشهٔ گیاهان را به‌خوبی کلنیزه کرد. با افزایش سطح‌های تنش کم‌آبی کلنیزاسیون ریشه پایهٔ رافلمون به‌طور معناداری کاهش یافت. کلنیزاسیون ریشه در پایهٔ نارنج در دورهای آبیاری ۲ و ۴

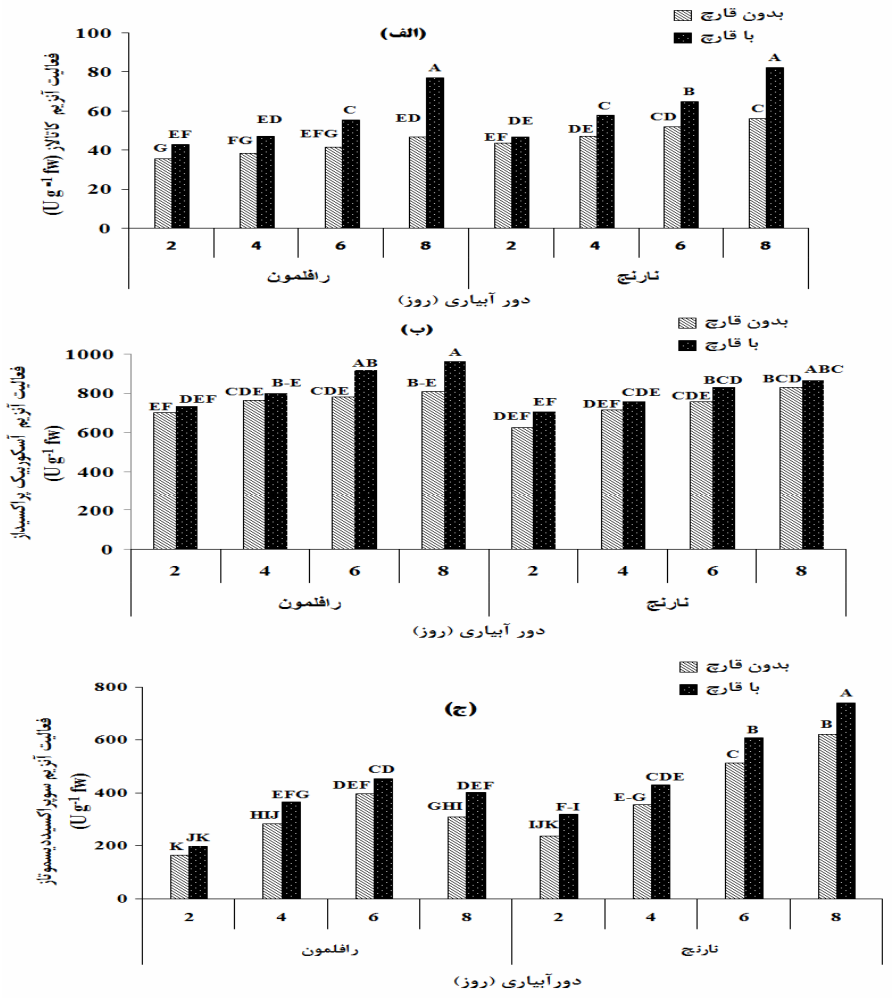
روز با یک‌دیگر اختلاف معنادار نداشت؛ ولی در دورهای آبیاری ۶ و ۸ روز با یک‌دیگر و با دو سطح دیگر اختلاف معنادار داشت. از مقایسهٔ دو پایه مشخص می‌شود کلنیزاسیون ریشه در تیمارهای تلقیح‌شده با قارچ در پایهٔ رافلمون در همهٔ سطح‌های تنش کم‌آبی اعمال‌شده بیشتر از کلنیزاسیون ریشهٔ پایهٔ نارنج است (شکل۱ الف). Wu and Zia (2006) گزارش کردند بالاترین درصد کلنیزاسیون ریشهٔ مرکبات در کاربرد با قارچ میکوریز زمانی بود که گیاه تحت تأثیر تنش کم‌آبی نبود. آنان به این نتیجه رسیدند که تنش کم‌آبی درصد کلنیزاسیون ریشهٔ مرکبات را کاهش می‌دهد. با کاهش رطوبت خاک، کمیت و کیفیت ترشحات ریشه‌ای تغییر می‌کند که بر تندش اسپور تأثیر می‌گذارد. کاهش رطوبت همچنین به‌طور مستقیم بر تندش اسپور تأثیر می‌گذارد (Smith and Read, 2008). Wu *et al* (2005) دریافتند که درصد کلنیزاسیون ریشه در گیاه نارنج سه‌برگ مایه‌زنی‌شده با قارچ گلوموس ورسیفرم در شرایط تنش کم‌آبی به‌طور معناداری کاهش می‌یابد و هیچ‌گونه اندام قارچی در گیاهان شاهد دیده نمی‌شود. در هر دو پایه، با افزایش شدت تنش کم‌آبی، عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه در هر دو تیمار دارای قارچ و بدون قارچ کاهش پیدا کرد. در تیمارهای تلقیح‌شده با گلوموس موسه عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه نسبت به تیمارهای تلقیح‌نشده همواره بیشتر بود (شکل ۱ ب). در زمان تنش کم‌آبی، با کاهش سرعت تقسیم سلولی و کاهش تعداد و سطح برگ، سرعت رشد گیاه کاهش می‌یابد و این عمل با ترشح هورمون‌های مؤثر در ریزش و هورمون‌های مؤثر در کاهش تقسیم سلولی صورت می‌گیرد. قارچ‌های میکوریز آربسکولار با بهبود وضعیت تغذیه‌ای و روابط آبی و تغییر در سطح ترکیبات هورمونی گیاه (Yao *et al*, 2005) انشعابات و حجم ریشهٔ گیاه را تغییر می‌دهد و باعث افزایش عملکرد مادهٔ خشک ریشه می‌شود (Lopez-Bucio *et al*, 2003).



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین اثر قارچ گلوموس موسه بر کلنیزاسیون ریشه (الف) و عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی (ب) و عملکرد مادهٔ خشک ریشه (ج) دو پایهٔ رافلمون و نارنج در شرایط تنش کم‌آبی

در تیمارهای میکوریزی و غیر میکوریزی با افزایش شدت تنش کم‌آبی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز در ریشهٔ هر دو پایه افزایش یافت که در همهٔ سطح‌های تنش کم‌آبی فعالیت آنزیم‌ها در تیمارهای دارای قارچ بیشتر از تیمارهای بدون قارچ بود. در تیمارهای بدون تلقیح با قارچ پایه‌های رافلمون و نارنج بین دورهای آبیاری ۲ ، ۴ و ۶ روز اختلاف معنادار در فعالیت آنزیم کاتالاز وجود نداشت؛ درصورتی‌که بین تیمار دور آبیاری ۸ روز و تیمارهای دورهای آبیاری ۲ و ۴ روز اختلاف معنادار وجود داشت (شکل ۲ الف).

در هر دو پایه، بیشترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربیک پراکسیداز در تیمارهای میکوریزی و دور آبیاری ۸ روز و کمترین فعالیت این دو آنزیم در تیمارهای تلقیح‌نشده با قارچ و در دور آبیاری ۲ روز بوده است (شکل ۲ الف و ب). در دورهای آبیاری ۴ ، ۶ و ۸ روز فعالیت آنزیم کاتالاز در پایهٔ نارنج میکوریزی و غیر میکوریزی در مقایسه با پایهٔ رافلمون میکوریزی و غیر میکوریزی بالاتر بود (شکل ۲ الف). در هر سطح تنش کم‌آبی فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز در پایه‌های میکوریزی و غیر میکوریزی رافلمون در مقایسه با نارنج اختلاف معنادار نداشت؛ هرچند در پایهٔ رافلمون، به‌خصوص در دورهای آبیاری ۶ و ۸ روز، بیشتر بود (شکل ۲ ب). در پایهٔ رافلمون با افزایش شدت تنش کم‌آبی تا دور آبیاری ۶ روز فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و در دور آبیاری ۸ روز کاهش پیدا کرد. ولی همواره در تیمارهای دارای قارچ نسبت به تیمارهای بدون قارچ فعالیت این آنزیم بیشتر بود. در پایهٔ نارنج با افزایش شدت تنش کم‌آبی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش پیدا کرد. در دورهای آبیاری ۲ و ۴ روز بین تیمارهای دارای قارچ و بدون قارچ اختلاف معنادار وجود نداشت. در سایر سطح‌های تنش کم‌آبی (دورهای آبیاری ۶ و ۸ روز) بین این تیمارها اختلاف معنادار دیده شد و در دور آبیاری ۸ روز به حداکثر رسید. مقایسهٔ دو پایهٔ بررسی‌شده نشان داد در همهٔ سطح‌های تنش کم‌آبی و تیمارهای باقارچ و بدون قارچ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در پایهٔ نارنج بیشتر از پایهٔ رافلمون است (شکل ۲ ج).



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین اثر قارچ گلوموس موسه بر فعالیت آنزیم کاتالاز (الف) و آسکوربیک پراکسیداز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز

(ج) ریشهٔ دو پایهٔ رافلمون و نارنج در شرایط تنش کم‌آبی

جدول ۲. تجزیهٔ واریانس کلنیزاسیون ریشه، عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی و ریشه و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربیک پراکسیداز ریشهٔ پایه‌های رافلمون و نارنج میکوریزی و غیر میکوریزی در شرایط تنش کم‌آبی

منابع تغییر	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات					
		کلنیزاسیون ریشه	عملکرد مادهٔ خشک اندام هوایی	عملکرد مادهٔ خشک ریشه	فعالیت آنزیم‌ها در ریشه		
					کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربیک پراکسیداز
تنش کم‌آبی	۳	۹۰۶/۹***	۴۵۸/۱۷***	۱۱/۶***	۱۱۹۹/۶***	۲۱۳۰۹۵/۸***	۶۹۴۸۰/۸***
قارچ	۱	۴۶۵۰۶/۷***	۴۳۱/۲۲***	۳/۵*	۲۴۵۴/۹***	۷۶۹۰۲/۲***	۶۲۹۸۲/۹**
پایه	۱	۱۴۹/۵*	۴۱۸/۴۴***	۳۹/۷***	۸۲۲/۹***	۲۹۵۰۸۵/۵***	۲۶۴۷۰/۸*
تنش کم‌آبی × قارچ	۳	۹۰۶/۹***	۰/۹۷ ^{ns}	۰/۱۱^{ns}	۲۹۷/۹***	۱۱۹۱/۸^{ns}	۲۹۵۱/۴^{ns}
تنش کم‌آبی × پایه	۳	۶/۶^{ns}	۲۰/۹۵*	۱/۰۲^{ns}	۱۰/۷^{ns}	۴۰۳۶۲/۸***	۱۷۸/۰۵^{ns}
پایه× قارچ	۱	۱۴۹/۵*	۱۵/۰۹ ^{ns}	۰/۲۵^{ns}	۱۰/۵^{ns}	۲۰۴۰/۵^{ns}	۳۰۶۳/۵^{ns}
تنش کم‌آبی × قارچ × پایه	۳	۶/۶^{ns}	۱/۰۲ ^{ns}	۰/۱۲^{ns}	۵/۸^{ns}	۴۹۰/۶^{ns}	۴۱۲۰/۴^{ns}
خطا	۳۲	۳۰/۲۷	۶/۳۶	۰/۴۸	۱۴/۸۵	۲۵۲۲	۵۲۱۵/۹۳
ضریب تغییرات	-	۱۷/۶۸	۱۲/۱۳	۱۵/۲۸	۷/۳۷	۱۲/۵۲	۹/۲۰

*** و ** و * به‌ترتیب در سطح ۰/۱ و ۱ و ۵ درصد معنادار است. ns از لحاظ آماری معنادار نیست.

در گیاهان عالی اکسیژن‌های فعال دائم در کلروپلاست و میتوکندری و پرکسیزوم تولید می‌شوند (Apel and Hirt, 2004). تولید و مهار اکسیژن‌های فعال به‌شدت وابسته به فراوانی آب است. هنگامی که گیاهان عالی در معرض تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند تعامل بین تولید و مهار اکسیژن به‌هم می‌خورد. در نتیجه تجمع اکسیژن‌های فعال سبب آسیب به پروتئین و DNA و لیپیدها می‌شود (Lacan and Baccou, 1998). از ترکیبات بسیار مهم در سیستم دفاع آنزیمی گیاهان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند که سبب مهار اکسیژن‌های فعال می‌شوند؛ از جمله سوپراکسید دیسموتاز که سبب تبدیل $O^{\cdot}_2{}^{-}$ به H_2O_2، کاتالاز که سبب تبدیل H_2O_2 به آب، و اکسیژن و آسکوربیک پراکسیداز که سبب تبدیل H_2O_2 به آب با استفاده از اسید آسکوربیک به منزلهٔ پذیرندهٔ الکترون می‌شوند (Gara *et al*, 2003). محققان علت زیادشدن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه را افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن هنگام تنش کم‌آبی می‌دانند. هم‌زیستی قارچ‌های میکوریز به‌شدت میزان H_2O_2 و $O^{\cdot}_2{}^{-}$ را کاهش می‌دهد که نشان‌دهندهٔ اثر قارچ میکوریز بر کاهش تجمع اکسیژن‌های فعال در گیاهان میزبان است (Salzer *et al*, 1999). Alguacil *et al* (2003) در بررسی اثر قارچ گلوموس کلاریدوم بر کاهو در شرایط تنش کم‌آبی نشان دادند تنش کم‌آبی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. همچنین Wu *et al* (2005) با بررسی اثر قارچ گلوموس موسه بر دانهال‌های مرکبات تلقیح‌شده با قارچ میکوریز در شرایط تنش کم‌آبی به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش کم‌آبی اشاره کردند. Ruiz-Lozano *et al* (1996) با بررسی اثر قارچ گلوموس موسه بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش کم‌آبی مشاهده کردند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای میکوریزی نسبت به تیمارهای بدون میکوریز بیشتر است. تنش کم‌آبی همچنین سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز در گیاهان میزبان می‌شود. Wu and Zia (2006) در دانهال‌های نارنج سه‌برگ تلقیح‌شده با قارچ گلوموس ورسیفرم مشاهده کردند، در شرایط تنش کم‌آبی و شرایط آب مناسب، قارچ میکوریز سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز نسبت به تیمارهای غیر میکوریزی می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر که Porcel and Ruiz-Lozano (2004) انجام دادند روشن شد گیاهان سویای تلقیح‌شده با قارچ گلوموس اینترارادیسز سبب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمارهای غیر میکوریزی در شرایط تنش کم‌آبی می‌شود. Wu *et al* (2008) و (2009) و Wu (2011) بر گیاه نارنج تلقیح‌شده با قارچ گلوموس ورسیفرم نتایجی مشابه به‌دست آوردند. نتیجه در پایهٔ رافلمون، که در سطح تنش کم‌آبی شدید فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافته، با نتایج تحقیق Wu *et al* (2009) بر گیاه نارنج سه‌برگ و تلقیح‌شده با قارچ گلوموس ورسیفرم در شرایط تنش کم‌آبی مشابه است. سیستم دفاعی گیاه تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را برای خنثی‌کردن شکل‌های سمی اکسیژن افزایش می‌دهد و قارچ شدت این افزایش را بهبود می‌بخشد. اما مکانیسمی که به‌وسیلهٔ آن قارچ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهد هنوز ناشناخته است. آنچه در پی می‌آید ممکن است در این زمینه نقش داشته باشند. ساختمان

شیمیایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز دارای ایزوآنزیم‌های فلزی مس و روی و منگنز است. فاکتورهای هورمونی ارسالی از طرف سلول به ژن‌ها برای بیان و ساخت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز حاوی عناصر روی و کلسیم است (Ajay *et al*, 2002). قارچ‌های میکوریز آربسکولار با افزایش جذب عناصر غذایی می‌توانند سبب ارسال بیشتر فاکتورهای هورمونی و افزایش فعالیت آنزیم‌ها شوند. قارچ همچنین بر بیان ژن‌ها ممکن است اثر مستقیم داشته باشد. در ساختمان اندام‌های قارچ‌مانند اسپور و هیف‌ها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شناسایی شدند (Palma *et al*, 1993) که همگی در افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند مؤثر باشند.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی قارچ میکوریز گلوموس موسه پایه‌های مرکبات مورد مطالعه را کلنیزه می‌کند؛ هرچند در بالاترین سطح تنش کم‌آبی مقدار کلنیزاسیون ریشه تا ۴۰ درصد کاهش می‌یابد. قارچ‌های میکوریز آربسکولار با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشهٔ گیاه مرکبات رشد گیاهان را در شرایط تنش کم‌آبی بهبود می‌بخشد و عملکرد مادهٔ خشک آن‌ها را افزایش می‌دهد.

REFERENCES

Ajay, A., Sairam, R. K., and Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current Science*, 82 82 (10), 1227-1238.

Alcamo, J., Henrichs, T., and Rosch, T. (2000). *Global Modeling and scenario analysis for the world commision on water for the 21th Century*, In proceedings of world water in 2025, Center for environmental systems research, Report A0002, University of Kassel, Germany.

Alguacil, M. M., Hernandez, J. A., Caravaea, F., Portillo, B., and Roldan, A. (2003). Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil, *Plant Physiology*, 118, 562-70.

Alscher, R. G., Donahue, J. L., and Cramer, C. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants, relationships in green cells, *Plant Physiology*, 100, 224-233.

Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Physiology*, 55, 373-99.

Asada, K. (1994). *In causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants* (eds Foyer, C. H. and Mullineaux, P. M.), CRC Press, Boca Raton, FL, 77-104.

Asada, K. and Takahashi, M. (1987). *In photoinhibition topics in photosynthesis* (eds D. J. Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arnten), Amsterdam, Elsevier, 9, 227-287.

Auge, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular- arbuscular mycorrhiza symbiosis, *Mycorrhiza*, 11, 3-42.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.

Bennoun, P, (1994). Chlororespiration revisited: mitochondrial– plastid interactions *in Chlamydomonas*, *Biochimica et Biophysica Acta,* 1186, 59-66.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., and Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and deceased levels of superoxide dismutase and catalase, *Journal of Experimental Botany*, 32, 93-101.

Gara, L. D., de Pinto, M. C., and Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-a- vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 863-70.

Haghighatnia, H., Nadian, H. A., and Rejali, F. (2011). Effects of mycorrhizal colonization on growth, nutrients uptake and some other characteristics of Citrus volkameriana rootstock under drought stress, *World Applied Sciences Journal*, 13 13 (5), 1077-1084.

Jihouni, M. (2012). *The principle of citrus nutrition in Iran*, Hasel Novin Agricultural Company, 44pp, (In Farsi).

Kormanik, P. P. and McGraw, A .C. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant root, In Schenk N .C (Ed.), *Methods and principles of mycorrhizal reseach*, The American Phytopathological Society, *St. Paul*, 37-45.

Lacan, D. and Baccou, J. C. (1998). High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non netted muskmelon fruits, *Planta*, 204, 377-82.

Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast, *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.

Palma, J. M., Longa, M. A., Del Rio, L. A., and Arines, J. (1993). Superoxide dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red clover plants, *Plant Physiology*, 87, 77-83.

Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress, *Journal of Experimental Botany*, 55, 1743-50.

Ruiz-Lozano, J. M., Azcon, R., and Palma, J. M. (1996). Superoxide dismutase activity in arbuscular-mycorrhizal *Lactuca sativa L.* plants

subjected to drought stress, *New Phytologist*, 134, 327-33.

Salzer, P., Corbiere, H., and Boller, T. (1999). Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*, *Planta*, 208, 319-25.

Sepaskhah, A. R. and Yarami, N. (2009). Interaction effects of irrigation regime and salinity on flower yield and growth of saffron, J*ournal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84 84 (2), 216-222.

Smakthin, V., Revenga, C., and Doll, P. (2004). *Taking into Account Environmental Water Requirements in Globalscale Water Resources Assessments*, Comprehensive Asessment of Water Management in Agriculture Research Report 2, IWMI, Colombo, Sri Lanka.

Smith, S. E. and Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press, London.

Wu, Q. S. (2011). Mycorrhizal efficacy of trifoliate orange seedlings on alleviating temperature stress, *Plant, Soil and Environment*, 57(10), 459-464.

Wu, Q. S. and Xia, R. X. (2006). Reactive oxygen metabolism in non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress, *Journal of Plant Physiology*, 163, 1101-1110.

Wu, Q. S., Xia, R. X., and Hu, Z. J. (2005). Effects of arbuscular mycorrhiza on drought tolerance of *Poncirus trifoliata*, *Chinese Journal of Applied Ecology*, 16, 459-63.

Wu, Q. S., Xia, R. X., and Zou, Y. N. (2008). Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 44 (1), 122-128.

Wu, Q. S., Zou, Y. N., and Xia, R. X. (2006). Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus roots*, European Journal of Soil Biology*, 42, 166-172.

Wu, Q. S., Zou, Y. N., Xia, R. X., and Wang, M. Y. (2007). Five *Glomus* species affect water relations of *Citrus tangerine* during drought stress, *Botanical Studies*, 48, 147-154.

Wu, Q. S., Zou, Y. N., Xiai, R. X., and Wangi, M. Y. (2009). Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus, *Soil, Environmental and Atmospheric Sciences*, 55 (10), 436-442.

Yao, Q., Zhu, H. H., and Chen J. Z. (2005). Growth responses and endogenous IAA and iPAs changes of litchi seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation, *Horticultural Science*, 105 (1), 145-151.

Zanganeh, S., Alian, E. M., Najafinia, M., Karampour, F., and Ghale Dozdani, H. A. (2002). Introduce of new arbuscular mycorrhizal fungi in rhizosphere of citrus of Iran, *Rostaniha*, 6, 32-77, (In Farsi).