

تأثیر قارچ ریشه *Glomus interaradices* بر روی فعالیت های آنزیمی و شرایط رشدی هشت ژنوتیپ گندم

سید کاظم صباغ*^۱، محمد رضا سرافراز اردکانی^۱، مرضیه طاهری^۱، حمید رضا بلوک یزدی^۲

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲- گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: Sksabbagh@yazd.ac.ir

DOI:10.22034/csrar.2020.119122

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۶

چکیده

استفاده از فرآورده های بیولوژیک مانند گونه های مختلف قارچ ریشه، در جهت تأمین بخشی از عناصر مورد نیاز گیاه به ویژه فسفر یکی از راه حل های اساسی و مفید در جهت بهبود شرایط رشدی گیاه می باشد. در این تحقیق واکنش میکوریزی ۷ رقم مختلف گندم به قارچ ریشه *Glomus interaradices* در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی در ۴ تکرار در شرایط گلخانه مورد بررسی و تأثیر قارچ بر شرایط رشدی و میزان تغییرات تعدادی از آنزیم های آنتی اکسیدانتی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ماکروسکوپی ریشه گیاهان میکوریزه شده و مقایسه با گیاهان بدون قارچ ریشه، بالاترین میزان میکوریزه شدن را در رقم وحشی *Ageilops tauchii* نشان داد. کمترین میزان میکوریزه شدن ریشه در ارقام زراعی گندم ثبت گردید. بیشترین درصد میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز به ترتیب در ارقام تجن، نارین و هانا که همگی از ارقام زراعی هستند نسبت به شاهد بدون قارچ ریشه مشاهده گردید. با توجه به داده های حاصل چنین می توان نتیجه گیری کرد که میکوریزاسیون اگرچه به ماهیت ژنتیکی و پلوتیدی گندم بستگی دارد ولی به طور مستقیم قادر به افزایش فعالیت های آنزیمی گیاه نمی شود؛ بنابراین افزایش میزان آنزیم های آنتی اکسیدانتی ارتباط مستقیمی با درصد میکوریزه شدن ریشه واریته های مختلف گندم ندارد.

کلمات کلیدی: آنزیم های آنتی اکسیدانتی، ارقام گندم وحشی و مدرن، همزیستی

مقدمه

گونه های گندم که به ترتیب دارای سه سری کروموزوم بوده و هگزپلوئید (genome AABBDD) و دو سری کروموزوم یا تتراپلوئید (genome AABB) نامیده می شوند حاصل هیبریداسیون و آلو پلی پلوئیدی سه گونه وحشی دیپلوئید مختلف می باشند (Marcussen et al., 2014). قارچ ریشه های آربوسکولاردار قارچ های خاکزی بوده که قادر به ارتباط همزیستی با اکثریت گونه های گیاهی داشته که در این بین گیاه گندم (*Triticum sp.*) یکی از آن ها می باشد. این قارچ ها در همه خاک های کره زمین، به فراوانی زیاد در خاک های کشاورزی و شدت کمتر در خاکهای بکر بدون گیاه وجود دارند. با این وجود، این رابطه همزیستی بین گیاه و قارچ حتی در خاک های کشاورزی مختلف کارایی متفاوتی دارد (Van der Heijden et al., 1998). مفهوم کارایی میکوریزی یک مفهوم زراعی است که به وسیله بسیاری از محققان جهت نشان دادن ارتباط متقابل این همزیستی بین ژنتیک گیاه میزبان و ژنتیک میکروارگانیسم مورد استفاده قرار می گیرد (Sawers et al., 2017). رابطه همزیستی میکوریزی یک ارتباط محیطی، گیاه همراه و نوع قارچ است. گیاهان با توجه به ساختار ژنتیکی

غلات یکی از منابع مهم تأمین کننده غذای مورد نیاز مردم کشورمان می باشد. خاک های مناطق خشک و نیمه خشک کشور ما که بیش از ۸۰٪ زمین های کشاورزی را تشکیل می دهد از نظر مواد آلی فقیر هستند و برای بهبود باروری و حاصلخیزی خاک های کشاورزی، افزودن مواد آلی به آن ها ضروری است. اما منابع محدود سنتی مواد آلی همچون کودهای حیوانی جوابگوی نیاز روزافزون بخش کشاورزی به کود آلی نیست. گندم از نظر کشاورزی و غذایی یکی از مهم ترین منابع تولید انرژی در کشورهای در حال توسعه می باشد که مقدار زیادی از منابع فسفر خاک را مورد استفاده قرار داده و وابستگی شدیدی به آن دارد. در این میان استفاده از فرآورده های بیولوژیک نظیر قارچ ریشه، در جهت تأمین بخشی از عناصر مورد نیاز گیاه به ویژه فسفر یکی از راه حل های اساسی و مفید در کشاورزی پایدار در نظر گرفته شود (Pellegrino et al., 2015). گندم نان یا نرم با نام علمی *Triticum aestivum* L. بیش از ۸۰ درصد سطح زیر کشت گندم دنیا را به خود اختصاص داده است و گندم سخت یا دوروم با نام علمی *Triticum durum* Desf در حدود ۲۰ درصد سطح زیر کشت در دنیا را شامل می شود. این

۱۰× تا ۴۰× مشاهده و شاخص درصد همزیستی مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل از مشاهدات در فرمول زیر قرار داده و درصد همزیستی برای هر رقم گندم محاسبه گردید.

$$/M = \frac{[(95 \times n_5) + (70 \times n_4) + (30 \times n_3) + (5 \times n_2) + (1 \times n_1)]}{N}$$

M تراکم قارچ ریشه برای هر رقم، تعداد قطعات موجود در کلاس ۵ (کلاس ۵ قطعات بالای ۹۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، تعداد قطعات موجود در کلاس ۴ (کلاس ۴ قطعات بالای ۵۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، تعداد قطعات موجود در کلاس ۳ (کلاس ۳ قطعات زیر ۵۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، تعداد قطعات موجود در کلاس ۲ (کلاس ۲ قطعات بالای ۱۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، تعداد قطعات موجود در کلاس ۱ (کلاس ۱ قطعات زیر ۱۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، N تعداد قطعات مورد مشاهده.

استخراج عصاره آنزیمی

جهت بررسی تغییرات آنزیمی نمونه برداری از گیاهان تیمار شده با قارچ - ریشه، ۴ ماه بعد از کشت ژنوتیپها در خاک حاوی قارچ ریشه انجام گردید و از برگ گیاهان برای عصاره گیری به روش گانگ و همکاران با کمی تغییرات نمونه برداری صورت گرفت (Gong et al., 2005). بدین منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت گیاهی در هاون چینی با ازت مایع فریز شده و سپس ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول بافر عصاره گیری (فسفات پتاسیم با PH=۶/۸)، ۲۰ میکرولیتر EDTA (۰/۱ مولار) و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر هموزن شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ از فاز بالایی عصاره برای اندازه گیری فعالیت آنزیمها استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیمی

آنزیم پراکسیداز

جهت تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به عصاره آنزیمی به دست آمده از گیاهان تیمار شده و شاهد، ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (PH=7)، ۴۰۰ میکرو لیتر گاپاکول یک میلی مولار، ۲۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۲۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۳ میلی مولار اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع می شود. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۷۵ نانومتر توسط دستگاه طیفسنج خوانده شد و یک دقیقه پس از افزودن آب اکسیژنه دوباره قرائت گردید (Dazy et al., 2008).

تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۴۰۰ میکرو لیتر بافر تریس ۰/۲ مولار (PH=7/6)، پیروگالول ۰/۰۲ مولار به میزان ۱ میلی لیتر، ۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر و اضافه شد. فعالیت

خود قدرت برقراری ارتباط مختلفی با این قارچ ها دارند. در ایران مطالعات زیادی در ارتباط با نقش تنش های زیستی و غیر زیست در میکوریزه شدن ارقام مختلف گندم (Gholami and Mahmoudi, 2015; Habibi et al., 2013) و محصولات دیگر کشاورزی (Esna-Ashari and Bahrami, 2018; Parvizi et al., 2017) به عمل آمده است ولی مطالعات چندانی در ارتباط با ژنتیک گیاه و رابطه همزیستی آنها در ژنوتیپ های مختلف گندم صورت نگرفته است. در این تحقیق پاسخ به میکوریزه شدن ژنوتیپ های مختلف گندم بوسیله قارچ ریشه *Glomus intraradices* مورد بررسی قرار گرفته و تاثیر آن بر شرایط رشدی و میزان تغییرات آنزیم های آنتی اکسیدانتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ارقام زراعی در حال کشت (سیستان، تجن، هانا، افق، نارین، MS-90-15)، تتراپلوئید (شبرنگ) و دیپلوئید (*tauschii Aegilops*) گندم استفاده گردید. بذر ارقام هگزپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و بذر رقم دیپلوئید از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه گردید. بذور موردنظر به وسیله محلول کلرآمی تی ۳ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس سه دفعه با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرها جهت جوانه زنی بر روی محیط کشت PDA قرار داده شدند و بعد از جوانه زنی تعداد ۱۰ عدد جوانه در ظروف پلاستیکی دو کیلویی (۲۰×۱۵cm) محتوی پیت ماس باغبانی استریل قرار داده شدند مقدار ۱۰۰ گرم خاک حاوی ۱۵۰۰ اسپور قارچ *G. intraradices* به هر گلدان حاوی گیاهچه های گندم اضافه شد. گلدانها در گلخانه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد (روز - شب) با نور و رطوبت مناسب و به صورت یک طرح بلوک های کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر ژنوتیپ نگهداری شده و آبیاری گلدانها به صورت دوره ای با محلول غذایی لانگستون انجام شد.

رنگ آمیزی و شمارش قارچ - ریشه ها در ریشه

برای ارزیابی میکوریزه شدن ریشه ها، بعد از مدت ۴ ماه، قسمت هایی از بافت ریشه قطع و به قسمت هایی کوچک تری به اندازه ۱ سانتی متر تبدیل و در محلول جوشان KOH قرار داده و به وسیله محلول رنگی تریپان بلو ۱٪ رنگ آمیزی شدند. ریشه های رنگ آمیزی شده جهت تعیین شاخص های میزان کلنیزاسیون میکوریزی مورد ارزیابی قرار گرفتند (Vierheilig et al., 1998). بدین منظور ابتدا ریشه های رنگ آمیزی شده را به قطعات ۰/۵ سانتی متری و به تعداد ۱۰ قطعه برش داده شد. بعد از تهیه اسلاید از نمونه ها، میزان ریشه های قارچی در ریشه با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

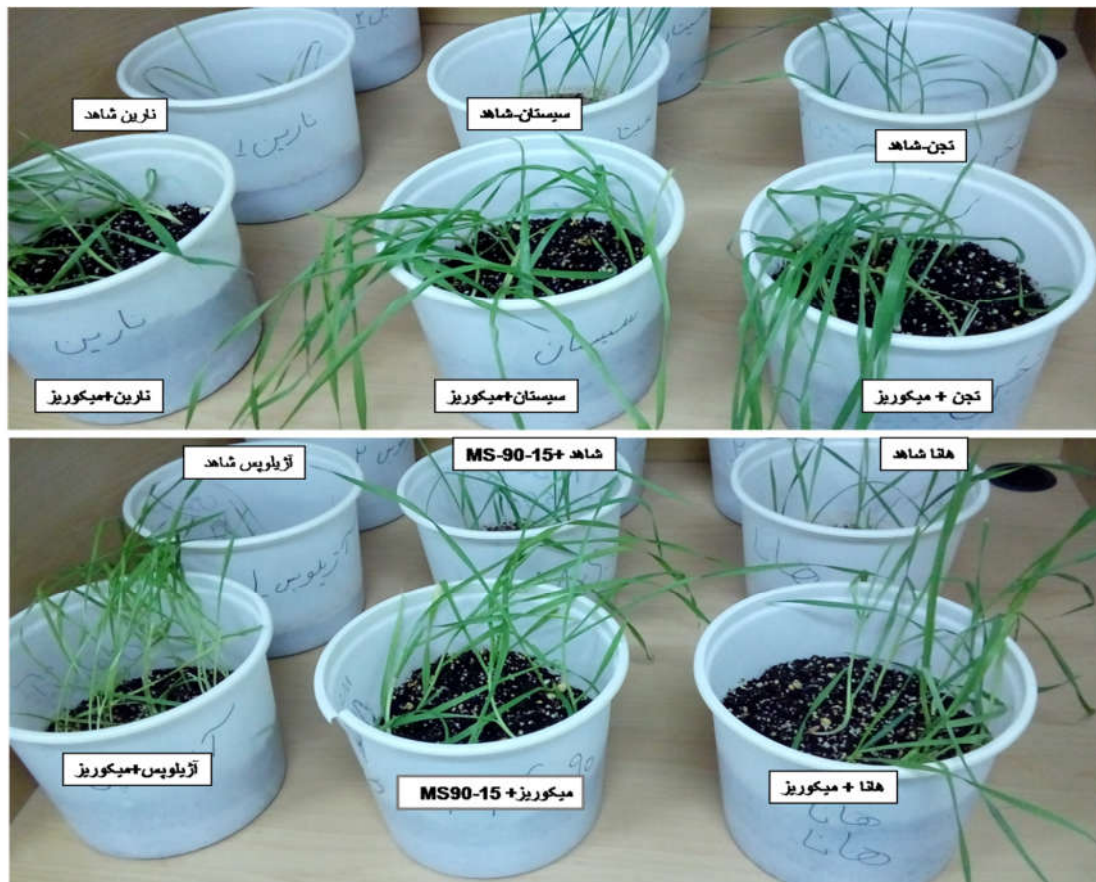
نتایج و بحث

بررسی خصوصیات فنوتیپی ارقام مختلف گندم تیمار شده با قارچ - ریشه نشان داد که ارقام مختلف نسبت به میکوریزه شدن واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این تغییر شرایط رشدی در گندم‌های مدرن هگزاپلوئید نسبت به ارقام دیگر مشهودتر بود ولی در رقم دیپلوئید *Aegilops tauschii* با توجه به ضعف بودن طبیعی ساختار فیزیکی بوته، این تغییر ساختاری و فنوتیپی مشهود نبود (شکل ۱).

آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر طیف‌سنج در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ ثانیه پس از افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد (Raymond *et al.*, 1993).

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید پراکسیداز

جهت تعیین میزان آنزیم سوپراکسید پراکسیداز از مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، متیونین ۰/۰۱ مولار، EDTA ۰/۱ میکرومولار و ریوفلاوین ۲ میکرومولار استفاده گردید و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شد. محلول واکنش بعد از افزودن عصاره گیاهی به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله ۲۰ سانتی‌متری از منبع نور قرار داده شد و در این فاصله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر و توسط محلول تاریکی به عنوان شاهد تنظیم شد. پس از این زمان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شدند. محلول تاریکی به عنوان شاهد جهت تنظیم دستگاه استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه گردید (Giannopolitis and Ries, 1997).

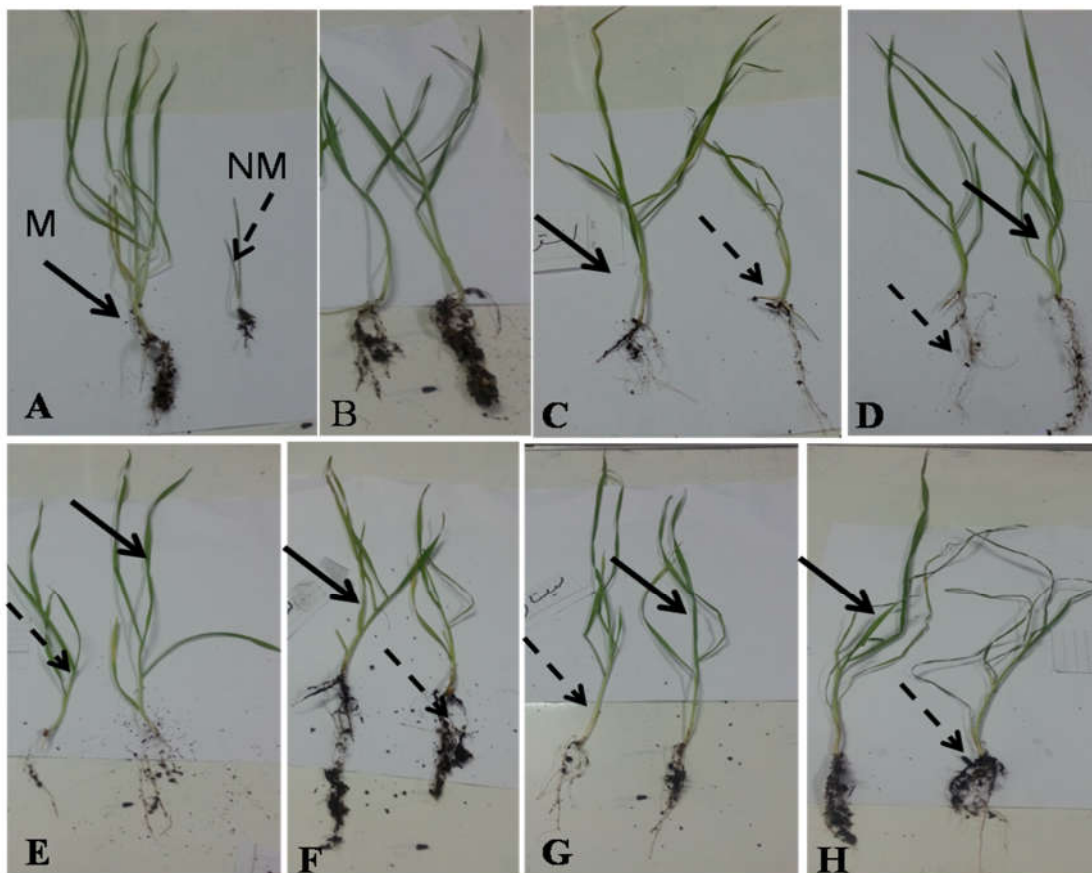


شکل ۱- خصوصیات ظاهری ارقام مختلف گندم تیمار شده با میکوریز و مقایسه با گیاهان بدون قارچ ریشه

Figure 1- Morphological characteristics of different wheat cultivar treated with mycorrhizal and compare to non-mycorrhizal Plants

است (Hetrick *et al.*, 1993). استفاده از ارقام حساس و مقاومت به بیماری سیاهک و گال ذرت ناشی از *Ustilago maydis* و بررسی قدرت میکوریزه شدن آنها نشان داد که بین ژنوتیپ های مختلف ذرت و غنای ریشه ارتباط مستقیم دارد درحالیکه عامل بیمارگر در شرایط مزرعه و گلخانه در تعیین جمعیت میکروبی منطقه ریزوسفر به ویژه قارچ های قارچ-ریشه نقش موثری ایجاد کرده است و هیچ ارتباطی بین مقاومت و حساسیت و میکوریزی شدن مشاهده نشد (Pan *et al.*, 2008). در این تحقیق بین ارقام مختلف در حالت قارچ ریشه و غیر قارچ ریشه در حجم ریشه تغییر ظاهری مشاهده گردید و نشان داده شد که در حالت کاربرد قارچ-ریشه مقدار بیوماس ریشه تغییر پیدا می کند ولی این تغییر در حجم ارتباط مستقیمی با وجود قارچ-ریشه در ریشه نداشت و این احتمالاً به ژنوتیپ رقم بوده است که منجر به این افزایش رشد گردیده است (شکل ۲).

گونه *Aegilops tauschii* جزء ارقام وحشی گندم های ایرانی می باشد و زیستگاه آن نوار حاشیه دریای خزر از استان گلستان تا مناطقی از استان اردبیل و همچنین مناطقی از شمال استان قزوین تا جنوب گیلان می باشد (Aghaei *et al.*, 2008). شناسایی گونه های همزیست با ارقام وحشی گندم با توجه به رابطه همزیستی اجدادی می تواند گامی موثر در بهینه سازی شرایط رشدی قارچ-ریشه ها با ریشه ارقام مدرن گندم بشمار آید. در یک مطالعه جامع اثر ترکیبی چندین گونه از قارچ قارچ-ریشه بر میکوریزه شدن ارقام مختلف پلوئیدی گندم شامل رقم های وحشی و هگزاپلوئید و دیپلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت و وابستگی کامل هر ژنوتیپ در جذب عنصر فسفر بوسیله قارچ-ریشه مورد آنالیز قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل مشخص گردید که تولید رقم های مدرن گندم منجر به کاهش قدرت ریشه این ارقام به پاسخ میکوریزاسیون گردیده



شکل ۲- مشاهده ریشه ارقام مختلف گندم تحت تأثیر میکوریزه شدن با قارچ ریشه و مقایسه با شاهد بدون قارچ ریشه. A. آزلوپس؛ B. تنجن؛ C. Ms90-15؛ D. شبرنگ؛ E. شبرنگ؛ F. افق؛ G. نارین؛ H. سیستان؛ H. هانا

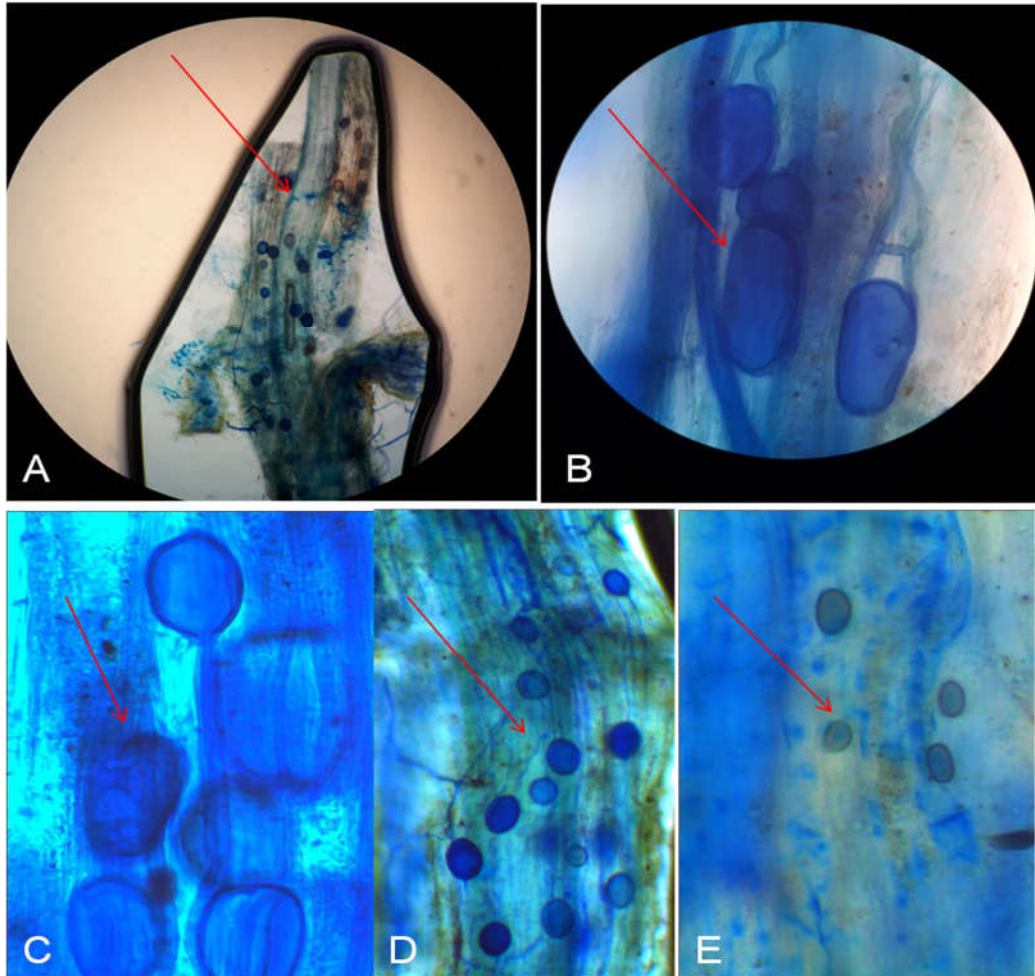
Figure 2- Observation of different wheat cultivars root treated with mycorrhizae and comparison with non-mycorrhizal control. Aegilops; B. Tajan; C. Ms90-15; D. Shabrang; E. Ofogh; F. Narin; G. Sistan; H. Hana.

(Tver and Niels, 1983) و همچنین ژنوتیپ گیاه (Azcon and Ocampo, 1981) اشاره نمود. در این تحقیق تنها نقش

عوامل موثری در میکوریزه شدن ریشه گیاهان نقش دارند که از آن جمله می توان به زمان کاشت گیاه و شرایط رشدی

وجود آربسکول ها در رقم وحشی *Aegilops tauschii* شکل گرفته است و این نشان دهنده وابستگی شدید رقم دیپلوئید به قارچ ریشه می باشد (شکل ۳).

ژنوتیپ گیاه مورد بررسی قرار گرفت که می تواند شدت میکوریزه شدن ژنوتیپ های مختلف را تحت تاثیر داده باشد. بررسی میکروسکوپی ریشه های میکوریزه شده و مقایسه آنها با همدیگر و گیاهان شاهد نشان داد که بارزترین ساختار قارچ ریشه شامل



شکل ۳- مشاهده هیف قارچی در ریشه ارقام مختلف گندم. A: قسمت قاعده ریشه آزیلوپس نزدیک به ساقه. B: تورمهای هیفی قارچ ریشه (وزیکول) در کورتکس ریشه آزیلوپس. C: وزیکول قارچ در تماس با غشاء سیتوپلاسمی به همراه هیف آورنده ریشه رقم آزیلوپس. D: اسپورهای قارچ ریشه رقم دیپلوئید شبرنگ. E: توسعه قارچ در رقم مدرن هانا

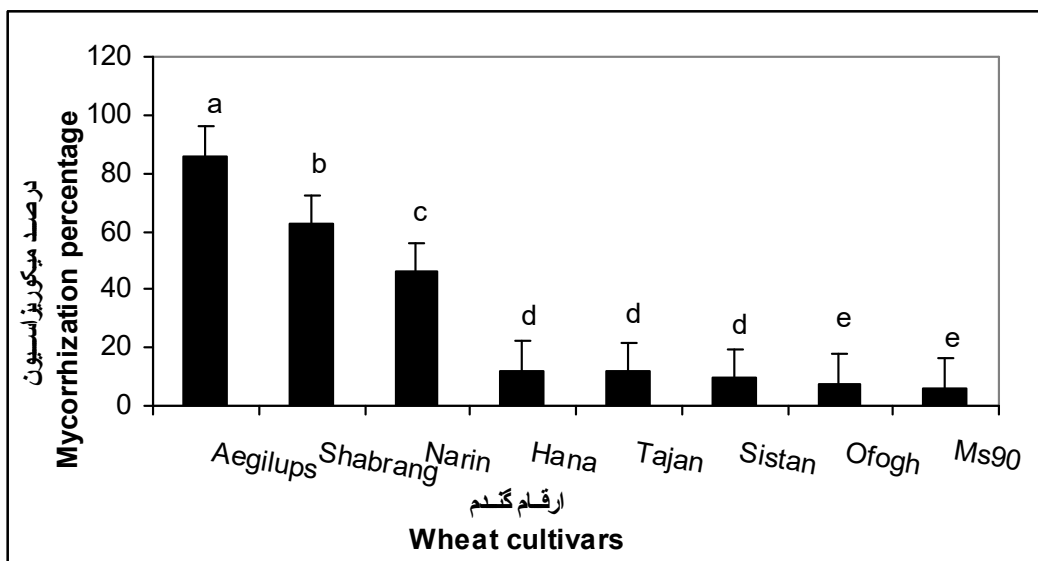
Figure 3- Observation of hyphal fungi in different root of wheat A: Basal part of root near to stem. B: hyphal swellings of mycorrhiza (Vesicles) in the root cortex of Aegilops. C: Mycorrhizal vesicles in contact with cell membrane accompanying sporophore. D: Mycorrhizal spores in external root layers of Shabrang root. E: Fungal development in modern wheat cultivar.

مطالعه ای دیگر این ارتباط مستقیم نفی شده است (Azcon and Ocampo, 1981). در مطالعه ای که از ژنوتیپ های مختلف گندم برای بررسی اثر میکوریزه شدن استفاده شده بود ارتباط مستقیمی بین میکوریزه شدن و پارامترهای رشدی مشاهده شده است (Hetrick *et al.*, 1993). در این مطالعه بین میکوریزی شدن ریشه و ژنوتیپ گندم ارتباط مستقیم مشاهده شد ولی ارتباط مستقیمی بین حجم و بیوماس ریشه و ژنوتیپ مشاهده نگردید.

به طور کلی حجم ریشه در اغلب ژنوتیپ های میکوریزه شده نسبت به غیر میکوریزه از افزایش قابل توجهی برخوردار بود. میزان میکوریزه شدن ریشه به وزن ریشه (Azcon and Ocampo, 1981)، میزان فسفر موجود در خاک (Lackie *et al.*, 1988) و همچنین محتوای قندی ریشه (Ratnayake *et al.*, 1978) بستگی دارد. در مطالعات مختلف انجام شده بر روی گندم نشان داده شده است که بین میکوریزه شدن و وابستگی ژنتیکی گیاهان به قارچ-ریشه ارتباط مستقیم وجود دارد (Rao *et al.*, 1990) در حالیکه در

آژیلوپس که یک رقم وحشی هست دیده شد درحالی که کمترین میزان حضور قارچ ریشه در ریشه رقم ms-90-15 مشاهده گردید (شکل ۴).

بررسی درصد میکوریزاسیون ریشه‌های گندم‌های مختلف از طریق رنگ‌آمیزی ریشه نشان داد که ارقام مختلف نسبت به واکنش میکوریزه شدن واکنش‌های مختلفی را نشان می‌دهند به طوری که بیشترین میزان میکوریزه شدن در رقم



شکل ۴- درصد میکوریزه شدن ارقام مختلف گندم با قارچ ریشه *Glomus intraradices*

(حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد).

Figure 4- Percentage of root colonization in different wheat cultivars with *Glomus intraradices*.

Same letters in each column represent no significant difference at 5% level by Duncan's test

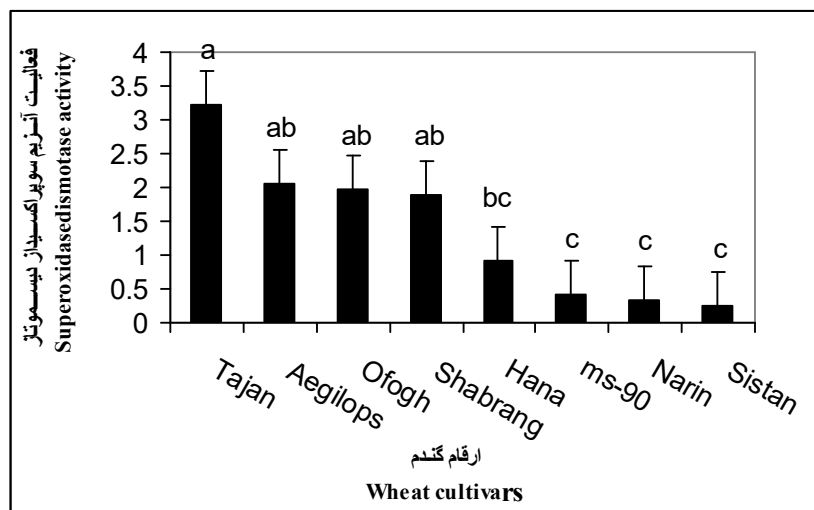
محسوسی در میکوریزه شدن ریشه های گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Zhongzha105) گردیده است ولی در هر دو تیمار شاهد و شوری میزان آنزیم های آنتی اکسیدانسی نظیر کاتالاز، سوپراکسیداز دیسموتاز و پراکسیداز افزایش پیدا کرد (Abdel Latef and Chaoxing, 2011) که با نتایج ما در این تحقیق مطابقت دارد. نتایج مربوط به سنجش میزان فعالیت آنزیمی نشان داد که در گیاهان تیمار شده با قارچ ریشه، هر سه آنزیم تحت تاثیر قرار گرفته و میزان تولید آنها افزایش یافته است (جدول ۱).

استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی یکی از مهم‌ترین ابزارهای موجود در تشخیص واکنش‌های گیاهی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی بشمار می‌آید. بررسی اثر تلقیح قلمه‌های ریشه‌دار شده سه رقم زیتون با سه گونه قارچ همزیست از جنس *Glomus* نشان داده است که میزان جذب عناصر غذایی فسفر، پتاسیم، آهن و روی در گیاهان تیمار شده با قارچ ریشه به مراتب بیشتر از شاهد بوده است (Esna-Ashari and Bahrami). بالطبع تیمار قارچ ریشه باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در راستای افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی خواهد شد. تنش شوری در گیاه باعث کاهش

جدول ۱- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی فنل اکسیداز در ارقام مختلف گندم در پاسخ میکوریزی

Table 1- Analysis of variance of related data to enzyme assay Proxidase, Superoxide dismutase and Polyphenol oxidase in different wheat cultivars to mycorrhizal response

| پراکسیداز Proxidase | پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase | سوپراکسیداز دیسموتاز Superoxide dismutase | درجه آزادی Df | تیمار Treatment |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|------------------|-------------------------|
| 0.006** | 0.070* | 3* | 7 | خطا Error |
| 0.0003 | 0.021 | 0.0016 | 16 | ضریب تغییرات (/) C.V |
| 231 | 7 | 6 | | |



شکل ۵- تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ارقام مختلف گندم تیمار شده با قارچ ریشه. (حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد.)

Figure 5- The change of superoxide dismutase enzyme in different wheat cultivars treated with mycorrhizal fungi. Same letters in each column represent no significant difference at 5% level by Duncan's test

(Kermanizadeh, 2016). آنالیز واریانس داده های حاصل از فعالیت آنزیمی نشان داد که تفاوت معنی داری مابین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام میکوریزی شده آژیلوپس، افق و شبرنگ دیده نمی شود. همچنین تفاوت معنی داری در فعالیت این آنزیم در ارقام میکوریزی شده نارین و هانا نیز دیده نمی شود. با اینحال فعالیت آنزیم در سایر ارقام میکوریزی شده تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند.

میزان تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاهان تیمار شده با قارچ ریشه در شکل ۵ مشاهده می شود. بیشترین میزان این تغییر در رقم تجن مشاهده گردید که یکی از ارقام مدرن گندم نان می باشد. این رقم نسبت به بیماری بلایت خوشه گندم حساس است و مشاهدات نشان داده است که کاربرد کودهای زیستی و مواد تقویت کننده رشد قادر به ایجاد مقاومت به بیماری گردیده است (Ghazimohseni et al., 2014;)

جدول ۲- آنالیز آماری t-test مربوط به ارتباط میانگین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ارقام مختلف گندم تیمار شده با قارچ ریشه *Glomus intraradices*.

Table 2- T- test statistical analysis related to mean of Polyphenoloxidase, Peroxidase and Superoxide dismutase enzyme activity in different wheat cultivars treated with mycorrhiza.

| ارقام Cultivar | برابری واریانس Equal of Variance | پلی فنل اکسیداز Polyphenoloxidase | | | پراکسیداز Peroxidase | | | سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase | | |
|-------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|-------|---------------------|-------------------------|-------|----------------------|--------------------------------------------|--------|-----------------------|
| | | t | df | Mean difference | t | df | Mean difference | t | df | Mean difference |
| Aegilops | Equal | 0.012 | 4 | 0.0373 | 4.018 | 4 | 0.136 ^{ab} | 5.046 | 4 | 2.042 ^{ab} |
| | unequal | 0.078 | 2.011 | 0.0373 | 4.068 | 2.053 | 0.136 ^{ab} | 4.096 | 2.003 | 2.042 ^{ab} |
| Ofogh | Equal | 0.0104 | 4 | 0.0676 | 2.022 | 4 | 0.080 | 1.009 | 4 | 0.89 ^{ab} |
| | unequal | 0.0706 | 2.024 | 0.0676 | 2.022 | 2.001 | 0.080 | 1.002 | 2 | 0.89 ^{ab} |
| Narin | Equal | 0.0032 | 4 | 0.0143 | 9.095 | 4 | 0.0240 ^{ab} | 3.078 | 4 | 3.007 ^a |
| | unequal | 0.0019 | 2.009 | 0.0143 | 9.007 | 3.002 | 0.0240 ^{ab} | 3.070 | 2.003 | 3.007 ^a |
| Tajan | Equal | 0.0056 | 4 | 0.0283 | 1.008 | 4 | 0.003 | 0.079 | 4 | 0.00076 ^{ab} |
| | unequal | 0.0041 | 2.003 | 0.0283 | 1.002 | 2.005 | 0.003 | 0.070 | 3 | 0.00076 ^{ab} |
| Sistan | Equal | 2.911 | 4 | 0.0873 ^a | 15.006 | 4 | 0.0296 ^{ab} | 2.050 | 4 | 2.0003 ^{ab} |
| | unequal | 2.007 | 2.005 | 0.0873 ^a | 15.001 | 2 | 0.0296 ^{ab} | 2.0021 | 4.027 | 2.0003 ^{ab} |
| Shabrang | Equal | 0.087 | 4 | 0.0143 | 13.004 | 4 | 0.466 ^{ab} | 4.0021 | 4 | 1.0042 ^{ab} |
| | unequal | 0.059 | 2.012 | 0.0143 | 13.001 | 2 | 0.466 ^{ab} | 4.0003 | 3.0003 | 1.0042 ^{ab} |
| Hana | Equal | 0.069 | 4 | 0.0409 | 21.078 | 4 | 0.0373 ^{ab} | 0.0012 | 4 | 1.0004 ^b |
| | unequal | 0.046 | 2.001 | 0.0409 | 21.007 | 2.013 | 0.0373 ^{ab} | 0.0003 | 2.001 | 1.0004 ^b |
| Ms-90 | Equal | 2.789 | 4 | 0.0677 ^a | 0.0019 | 4 | 0.00165 | 0.0004 | 4 | 0.00013 ^{ab} |
| | unequal | 2.780 | 2.071 | 0.0677 ^a | 0.0008 | 2.016 | 0.00165 | 0.0001 | 2 | 0.00013 ^{ab} |

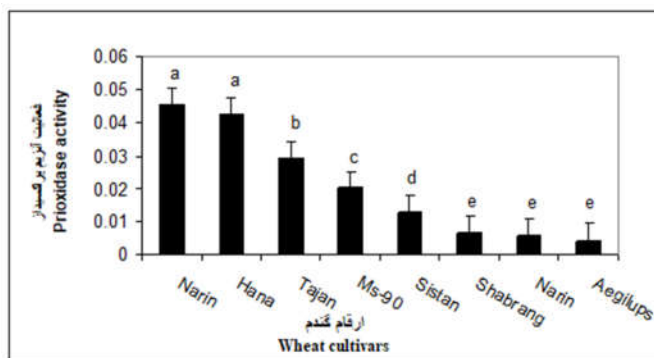
حرف a نشانه معنی داری تفاوت میانگینها در صورت تساوی واریانسها و حرف b در حالت عدم تساوی واریانسها در سطح خطای ۵٪ می باشد.

The letter a indicates a significant difference between the meanings in the case of equality of variances and the letter b in unequal state at the 0.05 level.

علاوه بر این نقش این قارچها و تاثیر بر فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان از طریق تغییر در منابع غذایی در گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در گیاه پسته کاربرد قارچ ریشه به همراه اسید سالیسیلیک توانایی گیاهچه های پسته را در جذب پتاسیم و فسفر افزایش داده است در حالیکه تاثیر اسیدسالیسیلیک بدون قارچ ریشه بسیار ناچیز بوده است (Shamshiri *et al.*, 2014). آنزیم پلی فنل اکسیداز یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانتی مهم در فعالیت لیگنینی و همچنین مکانیسم های دفاعی گیاهان از طریق تولید ترکیبات پلی فنلی نظیر رنگدانه ملانین می باشد (Constabel *et al.*, 2000; Mayer, 2006). در این مطالعه اثر قارچ ریشه در ارقام مختلف گندم بدون وجود هیچ تنشی در افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که فعالیت آنزیم در ارقام مختلف نوسانات کمتری نسبت به آنزیم پراکسیداز در میزان بیان دارا می باشد به طوری که بین بالاترین و پایین ترین میزان فعالیت آنزیم تفاوت فاحشی در اغلب ارقام بجز رقم ms-90-15 مشاهده نگردید (شکل ۷).

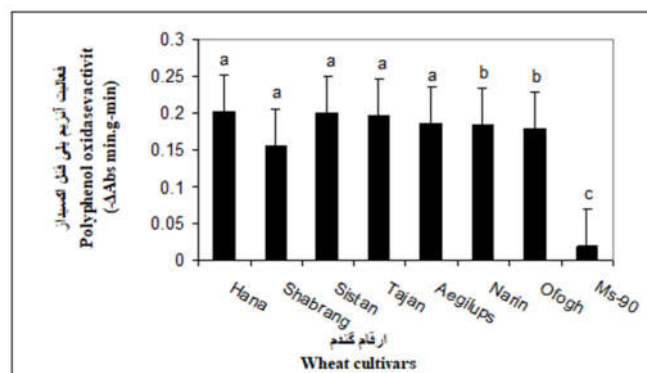
مقایسه آن با گیاهان بدون قارچ ریشه نشان داد که بیشترین میزان تغییرات در رقم نارین و کمترین آن در رقم وحشی آژیلوپس مشاهده و ثبت گردید (شکل ۶).

کمترین میزان آنزیم در ارقام سیستان، نارین و ms-90-15 مشاهده گردید. رقم آژیلوپس که یک رقم دیپلوئید می باشد و درصد کلونیزه شدن بیشتری را نشان داد با کمی اختلاف در رده دوم افزایش آنزیم قرار گرفت. با توجه به نقش کلیدی این آنزیم در بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در حالت میکوریزی و نقش قارچ ریشه ها در افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی در گیاهان مختلف در مواجهه با تنش های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در گیاه گوجه فرنگی تحت تنش شوری، کاربرد قارچ ریشه باعث افزایش میزان قابل توجهی از انواع مختلف آنزیم های آنتی اکسیدانتی گردیده است (Abdel Latef and Chaoxing, 2011). تحت تنش رطوبتی در گیاه گندم (*Triticum aestivum* L cv. Sakha 93) کاربرد قارچ ریشه باعث افزایش میزان آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز شده است (Khalafallah and Abo-Ghalia, 2008) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۶- فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام گندم تحت تیمار میکوریز. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد.

Figure 6- Proxodase enzyme activity in different wheat cultivars treated with mycorrhizal fungi. Same letters in each column represent no significant difference at 5% level by Duncan's test



شکل ۷- اثر قارچ میکوریز بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در ارقام مختلف گندم. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد.

Figure 7- The effect of mycorrhizal fungi on Polyphenol oxidase enzyme activity in different wheat cultivars treated with mycorrhizal fungi. Same letters in each column represent no significant difference at 5% level by Duncan's test

و بسیار قوی سازگار با گندم با توانایی بالا در میکوریزه کردن گندم می باشد. بررسی فلور قارچی نواحی جنگلی با استفاده از روش Pyrosequencing analysis نشان از تنوع بالای زیستی گونه های قارچی بوده است (Bue et al., 2009) که این تحقیقات نشان از وجود اشتقاق گونه های قارچی با پتانسیل های مختلف زیستی در خاک می باشد.

نتیجه گیری

استفاده از کودهای زیستی در راستای دستیابی به کشاورزی پایدار از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در این تحقیق بررسی پاسخ میکوریزی چند ژنوتیپ مختلف گندم به قارچ ریشه *Glomus intraradices* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه میکروسکوپی نشان داد که ژنوتیپ هایی که دارای سری های کروموزومی کمتری بودند (ژنوتیپ وحشی و دیپلوئید) میزان پذیرش قارچ ریشه نسبت به ارقام هگزاپلوئید بیشتر بود که این می تواند ناشی از نیاز میرم گیاهان دیپلوئیدی به این قارچها در رفع نیازهای غذایی خود باشد ولی بررسی میزان فعالیت آنزیمی نشان داد که بین میکوریزه شدن و تغییرات آنزیمی ارتباط مستقیمی وجود ندارد این نتیجه در ارتباط با این گونه میکوریزی صادق می باشد. با توجه به اینکه میکوریزه شدن می تواند ریشه گیاه را در برابر عوامل میکروبی مضر محافظت کند، به طور غیرمستقیم قادر خواهد بود عملکرد محصول را افزایش دهد؛ بنابراین توصیه می شود با استفاده از فلور میکروبی ریشه ارقام وحشی گندم گونه هایی میکوریزی جدید و قوی تر جداسازی و تأثیر آنها بر ارقام زراعی مورد ارزیابی قرار و در تهیه کودهای بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

این نتایج نشان دهنده پاسخ فیزیولوژیک مثبت تمام ارقام به قارچ ریشه می باشد که با توجه به نقش آنزیم در افزایش فعالیت های مقاومتی، می توان به کاربرد قارچ ریشه در برخورد با تنش های زنده نظیر عوامل بیماری زا امیدوار بود. وابستگی وارپته های مختلف گندم از تیپ وحشی تا مدرن به گونه های مختلف قارچ ریشه حاکی از تنوع بسیار بالای این همزیستی در ژنوتیپ های مختلف گندم می باشد به طوری که حتی در رقم های وحشی دیپلوئیدی هم، درصد میکوریزه شدن و وابستگی میکوریزی متغیر می باشد. بررسی میکوریزه شده رقم دیپلوئید *Triticum monoccocum* (A Genome) نشان داده است که علی رغم درصد بالای میکوریزه شدن ریشه، میزان وابستگی میکوریزی (Mycorrhizal dependence) و پاسخ رشدی (Growth response) در این رقم منفی بود بدین صورت که میزان وزن خشک گیاه در حالت میکوریزی به شدت کاهش یافته بود (Hetrick et al., 1993). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که در رقم *Aegilops tauchi* وزن خشک و بیوماس گیاه تیمار شده با قارچ ریشه نسبت با شاهد بدون قارچ ریشه کاهش داشته است که نشان دهنده پاسخ رشدی منفی این گونه به میکوریزه شدن می باشد (شکل ۳-۲) و با مطالعات مشابه انجام شده مطابقت دارد. با توجه به اطلاعات موجود مشخص شده است که اصلاح وارپته های گندم و تولید لاین های مدرن باعث کاهش وابستگی به گونه های قارچ ریشه شناخته شده در جهت استفاده از بعضی منابع غذایی خاک بویژه فسفر گردیده است. با این حال نباید از گونه های مختلف ناشناخته قارچ ریشه که در ناحیه ریزوسفر ارقام وحشی وجود دارن غافل گردید. استفاده از توالی یابی نسل سوم (Next generation) گامی موثر در یافتن گونه های جدید

References

- Abdel Latef, A. and Chaoxing, H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3): 228-233.
- Aghaei, M.J., Mozafari, J., Taleei, A.R., Naghavi, M.R. and Omid, M. 2008. Distribution and diversity of *Aegilops tauschii* in Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3): 341 .
- Azcon, R. and Ocampo, J.A. 1981. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist*, 87(4): 677-685 .
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J. and Christopher, M.E. 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 124(1): 285-296 .
- Dazy, M., Jung, V., Ferard, J. and Masfarau, J. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. *Chemosphere*, 74, 57-63 .
- Esna-Ashari, M. and Bahrami, B. 2018. Symbiosis effect of three mycorrhizal fungi (*glomos spp.*) on growth and the absorption of some nutrient elements in rooted cuttings of three olive cultivars. *The Plant Production*, 41(1): 1-14 .
- Ghazimohseni, V., Sabbagh, S.K., Esmailzadeh Bahabadi, S. and Ghorbani, M. 2014. Application of silicon in induction of systemic resistance against fusarium wheat head blight disease. *Biological Control of Pest and Plant Dosease*, 2(3): 128-137 .

- Gholami, A. and Mahmoudi, M.** 2015. Investigation the effect of mycorrhiza fungus (vam) and amounts of phosphorus fertilizer on qualitative and quantitative characteristics of *Zea mays* single cross Karoon. *Crop Physiology Journal*, 6(22): 115-130 .
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K.** 1997. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314 .
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S. and Zhang, C.** 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169(2): 313-321
- Habibi, S., Farzaneh, M. and Mesgarbashi, M.** 2013. The effect of mycorrhizal fungi on growth and wheat absorption of nutrient elements in saline condition. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 44(3): 311-320.
- Hetrick, B., Wilson, G. and Cox, T.** 1993. Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors: A synthesis. *Canadian Journal of Botany*, 71(3): 512-518 .
- Kermanizadeh, B., Gholamalizadeh Ahangar, A., Sabbagh, S.K. and Sirousmehr, A.** 2016. Effect of arbuscular mycorrhiza fungi and organic fertilizers on yield and nutrients uptake of two wheat cultivars. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 7(26): 59-69 .
- Khalafallah, A.A. and Abo-Ghalia, H.H.** 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. *Journal of Applied Science Research*, 4(5): 559-569 .
- Lackie, S., Bowley, S. and Peterson, R.** 1988. Comparison of colonization among half-sib families of *Medicago sativa* l. By *Glomus versiforme*. *New Phytologist*, 108(4): 477-482 .
- Bue, M., B., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S. and Martin, F.** 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184, 449-456 .
- Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., Jakobsen, K.S., Wulff, B.B., Steuernagel, B., Mayer, K.F. and Olsen, O. A.** 2014. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, 345(6194): 125-192 .
- Mayer, A.M.** 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? *A review. Phytochemistry*, 67(21): 2318-2331 .
- Pan, J.J., Baumgarten, A.M. and May, G.** 2008. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). *New Phytologist*, 178(1): 147-156 .
- Parvizi, K., Parvizi, Y. and Navaei, A.** 2017. Effect of arbuscular mycorrhizal (am) fungus (*Rhizophagus irregularis*) inoculation in different levels of water deficit on Minituber production in potato. *The Plant Production*, 40(3): 15-26 .
- Pellegrino, E., Öpik, M., Bonari, E. and Ercoli, L.** 2015. Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 210-217 .
- Rao, P.K., Tilak, K. and Arunachalam, V.** 1990. Genetic variation for VA mycorrhiza-dependent phosphate mobilisation in groundnut (*Arachis hypogaea* l.). *Plant and Soil*, 122(1): 7-13
- Ratnayake, M., Leonard, R. and Menge, J.** 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist*, 81(3): 543-552 .
- Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J. L.** 1993. Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 34, 927-931 .
- Sawers, R.J., Svane, S.F., Quan, C., Grönlund, M., Wozniak, B., Gebreselassie, M.N., González-Muñoz, E., Chávez Montes, R.A., Baxter, I. and Goudet, J.** 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding pht1 phosphate transporters. *New Phytologist*, 214(2): 632-643 .
- Shamshiri, M.H., Hasan, M.R., Karimi, H.R. and EsmailZadeh, M.** 2014. Effect of arbuscular mycorrhizae and salicylic acid on nutrient elements content of pistachio seedling under drought stress. *Journal of Plant Production*, 38(1), 75-89 .
- Tver, J. and Niels, E.** 1983. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in field grown crops. *New Phytologist*, 93(3), 401-413 .
- Van der Heijden, M.G., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I.R.** 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706): 69-72 .
- Vierheilig, H., Bago, B., Albrecht, C., Poulin, M.-J. and Piché, Y.** 1998. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. *Flavonoids in the Living System*, 439, 9-33.

Effect of *Glomus intraradices* fungus on enzymatic activities and growth condition of seven wheat genotypes

Seyed Kazem Sabbagh*¹, Mohammad Reza Sarafraz-Ardakani¹, Marziyeh Taheri¹, Hamid Reza Bolok-Yazdi²

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Yazd University, Yazd, Iran

²Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding Author: Sksabbagh@yazd.ac.ir

Received: 08 October 2018

Accepted: 02 December 2018

DOI:10.22034/csrar.2020.119122

Abstract

Use of biological products such as mycorrhizal fungi species, in order to provide part of the plant's essential elements, especially phosphorus, is one of the essential and useful solutions for improving plant growth conditions. In this research, the mycorrhizal reaction of seven different wheat varieties to *Glomus intraradices* species was assayed in randomized complete block design with four replications in the greenhouse. Growth conditions and also the effect of fungi on the growth condition and level of some antioxidant enzymes were evaluated. Macroscopic examination on roots of mycorrhizal plants and comparison with non-mycorrhizal plants showed a high percentage of root mycorrhization in wild wheat *Ageilops tauchii*. The lowest increase of root mycorrhization was determined in bread wheat cultivars. The highest levels of superoxide dismutase, peroxidase and polyphenol oxidase enzymes were observed in Tajan, Narin and Hana cultivars all of which are modern wheat cultivars. According to these data, it can be concluded that root mycorrhization, although it is dependent on the genetic and ploidy nature of wheat, cannot directly increase the enzymatic responses of the plant. So, increase in antioxidant enzymes did not directly correlate with the percentage of root mycorrhization in different varieties of wheat.

Key words: Antioxidant enzymes, Symbiosis, Wild and modern wheat cultivar

