تاثیر 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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۱ **DOI:10.22034/csrar.2020.119122**

چکیده

استفاده از فرآورده‌های بیولوژیک مانند گونه‌های مختلف قارچ ریشه، درجهت تأمین بخشی از عناصر مورد نیاز گیاه به ویژه فسفر یکی از راه حل‌های اساسی و مفید درجهت بهبود شرایط رشدی گیاه می باشد. در این تحقیق واکنش میکوریزی ۷ رقم مختلف گندم به قارچ ریشه *Glomus interaradices* در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در ۴ تکرار در شرایط گلخانه مورد بررسی و تاثیر 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 داده‌های حاصل چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میکوریزاسیون اگرچه به ماهیت ژنتیکی و پلوئیدی گندم بستگی دارد ولی به طور مستقیم قادر به افزایش فعالیت‌های آنزیمی گیاه نمی‌شود؛ بنابراین افزایش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی ارتباط مستقیمی با درصد میکوریزه شدن ریشه واریته‌های مختلف گندم ندارد.

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

مقدمه

غلات یکی از منابع مهم تأمین‌کننده غذای موردنیاز مردم کشورمان می‌باشد. خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور ما که بیش از ۸۰٪ زمین‌های کشاورزی را تشکیل می‌دهد از نظر مواد آلی فقیر هستند و برای بهبود باروری و حاصلخیزی خاک‌های کشاورزی، افزودن مواد آلی به آن‌ها 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 مهم‌ترین منابع تولید انرژی در کشورهای درحال‌توسعه می‌باشد که مقدار زیادی از منابع فسفر خاک را مورد استفاده قرار داده و وابستگی شدیدی به آن دارد. در این میان استفاده از فرآورده‌های بیولوژیک نظیر قارچ ریشه، درجهت تأمین بخشی از عناصر مورد نیاز گیاه به ویژه فسفر یکی از راه حل‌های 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 گونه های گندم که به ترتیب دارای سه سری کروموزوم بوده و هگزاپلوئید (genome AABBDD) و دو سری کروموزوم یا تتراپلوئید (genome AABB) نامیده می شوند حاصل هیبریداسیون و آللو 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 اکوفیزیولوژیک است و میزان موفقیت آن در گرو برآیند تاثیر محیط،گیاه همراه و نوع قارچ است. گیاهان با توجه به ساختار ژنتیکی

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 هگزاپلوئید وتتراپلوئید 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 جوانه‌زنی بر روی محیط کشت PDA قرار داده شدند و بعد از جوانه‌زنی 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 گیاهچه‌های گندم اضافه شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد (روز - شب) با نور و رطوبت مناسب و به صورت یک طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر ژنوتیپ نگهداری شده و آبیاری گلدان‌ها به‌صورت دوره‌ای با محلول غذایی لانگشتون انجام شد.

رنگ‌آمیزی و شمارش قارچ - ریشه‌ها در ریشه

برای ارزیابی میکوریزه شدن ریشه‌ها، بعد از مدت ۴ ماه، قسمت‌هایی از بافت ریشه قطع و به قسمت‌هایی کوچک‌تری به‌اندازه ۱ سانتی‌متر تبدیل و در محلول جوشان KOH قرار داده و به وسیله محلول رنگی تریپان بلو ۱٪ رنگ‌آمیزی شدند. ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده جهت تعیین شاخص‌های 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 نمونه‌ها، میزان ریسه های قارچی در ریشه با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰تا ×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 کلاس۱(کلاس ۱ قطعات زیر ۱۰٪ آلودگی قارچ - ریشه)، N تعداد قطعات مورد مشاهده.

استخراج عصاره آنزیمی

جهت بررسی تغییرات آنزیمی نمونه‌برداری از گیاهان تیمارشده با قارچ - ریشه، ۴ ماه بعد از کشت ژنوتیپها در خاک حاوی قارچ ریشه انجام گردید و از برگ گیاهان برای عصاره‌گیری به روش گانگ و همکاران با کمی تغییرات نمونه‌برداری 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 عصاره‌گیری (فسفات پتاسیم با PH= ۶/۸)، ۲۰ میکرولیتر EDTA (۰/۱ مولار) و ۳۸۰ میکرولیتر آب مقطر هموژن شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ از فاز بالایی عصاره برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیمی

آنزیم پراکسیداز

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

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

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

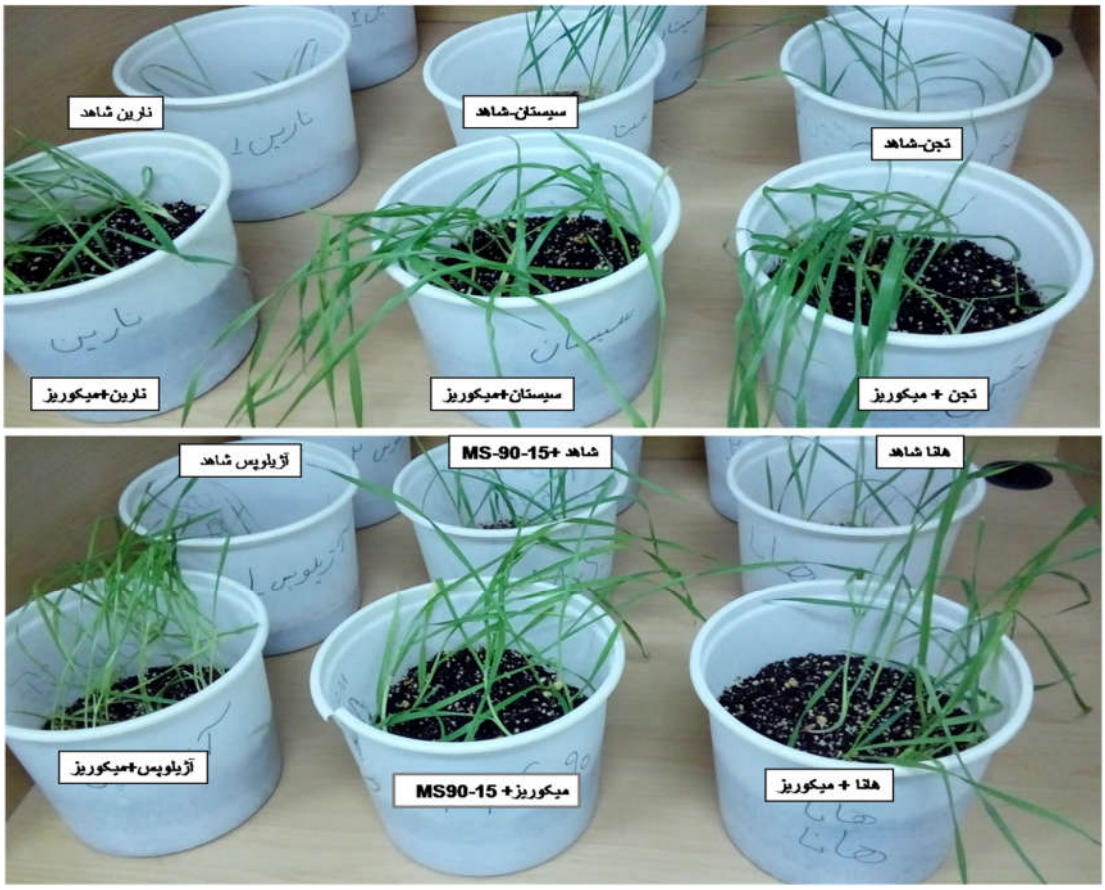
جهت تعیین میزان آنزیم سوپراکسید پراکسیداز از مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، متیونین ۰/۰۱ مولار، EDTA ۰/۱ میکرومولار و ریبوفلاوین ۲ میکرومولار استفاده گردید و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شد. محلول واکنش بعد از افزودن عصاره گیاهی به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله ۲۰ سانتی‌متری از منبع نور قرار داده 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).

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

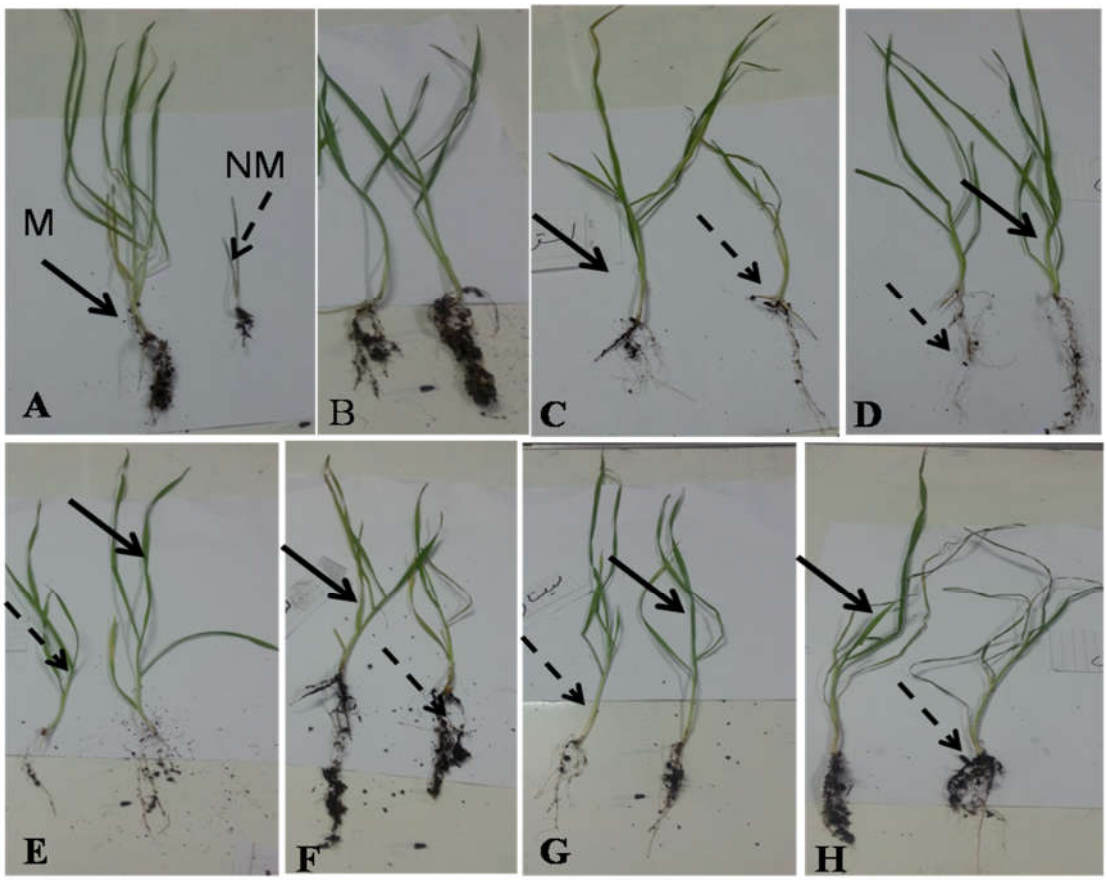
بررسی خصوصیات فنوتیپی ارقام مختلف گندم تیمار شده با قارچ - ریشه نشان داد که ارقام مختلف نسبت به میکوریزه شدن واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این تغییر شرایط رشدی در گندم‌های مدرن هگزاپلوئید نسبت به ارقام دیگر مشهودتر بود ولی در رقم دیپلوئید *Aegilops tauschii* با توجه به ضعیف بودن طبیعی ساختار فیزیکی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



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

گونه *Aegilops tauschii* جزء ارقام وحشی گندم‌های ایرانی می‌باشد 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 می‌باشد(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 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).

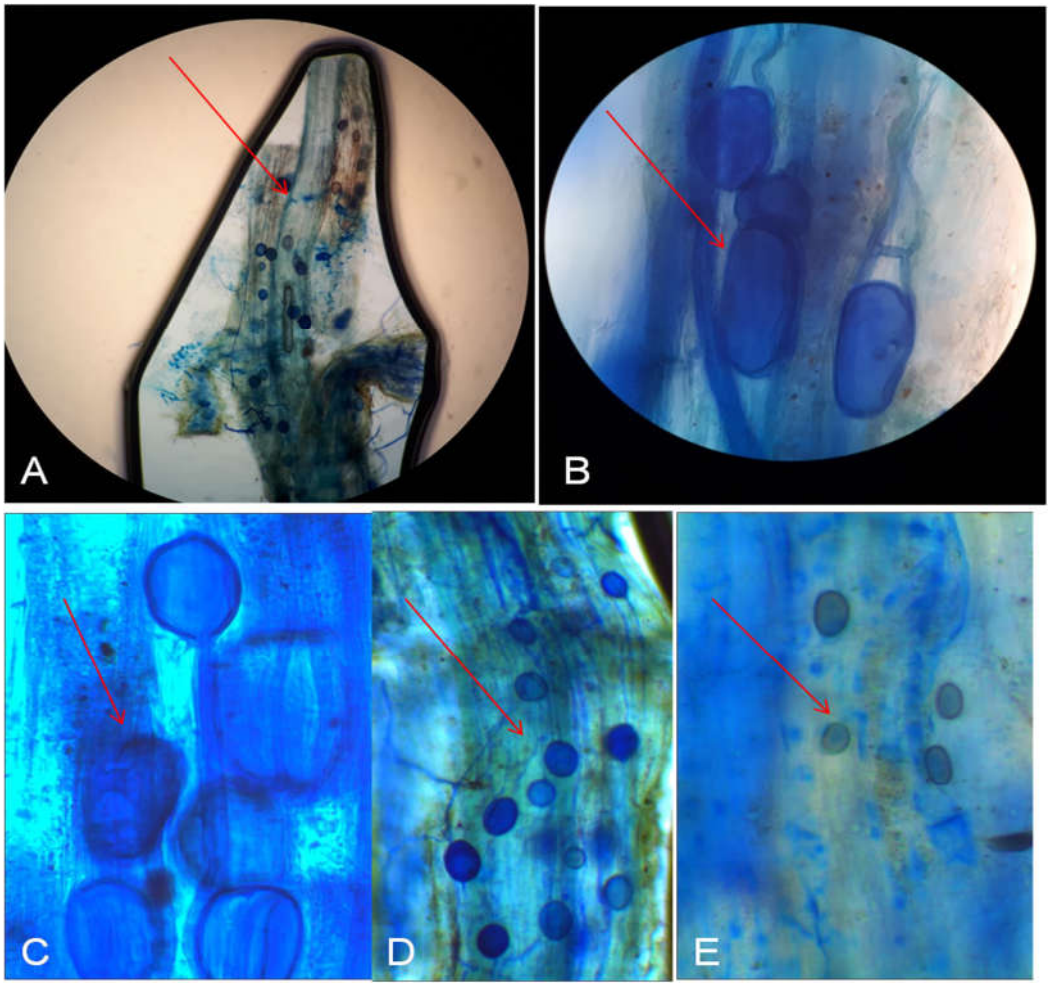


شکل ۲- مشاهده ریشه ارقام مختلف گندم تحت تأثیر میکریزه شدن با قارچ ریشه و مقایسه با شاهد بدون قارچ ریشه.A . آزیلوپس: B . تجن: C . D: MS90-15 . شبرنگ: E . افق: F . نارین:G .سیستان: H . هانا

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.

عوامل موثری در میکوریزه شدن ریشه گیاهان نقش دارند که از آن جمله می‌توان به زمان کاشت گیاه و شرایط رشدی (Tver and Niels, 1983) و همچنین ژنوتیپ گیاه (Azcon and Ocampo, 1981) اشاره نمود. در این تحقیق تنها نقش

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

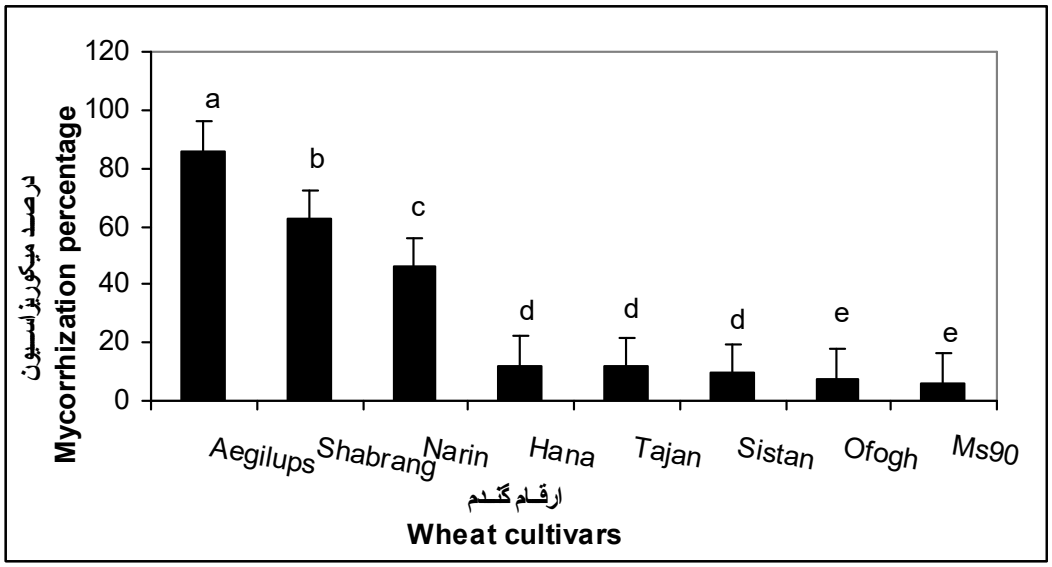


شکل ۳- مشاهده هیف قارچی در ریشه ارقام مختلف گندم. A: قسمت قاعده ریشه آژیلوپس نزدیک به ساقه. B: تورمهای هیفی قارچ ریشه (وزیکول) در کورتکس ریشه آژیلوپس. C: وزیکول قارچ در تماس با غشاء سیتوپلاسمی به همراه هیف آورنده ریشه رقم آژیلوپس. D: اسپورهای قارچ ریشه رقم دیپلوئید شبرنگ. E : توسعه قارچ در رقم مدرن هانا

Figure 3 -Observation of hyphal fungi in different root of wheat A: Basal part of root near to stem. B: hyphal swellings of mycorrhza (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.

به‌طورکلی حجم ریشه در اغلب ژنوتیپ های میکوریزه شده نسبت به غیر میکوریزه از افزایش قابل‌توجهی 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 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 مشاهد شد ولی ارتباط مستقیمی بین حجم و بیوماس ریشه و ژنوتیپ مشاهده نگردید.

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

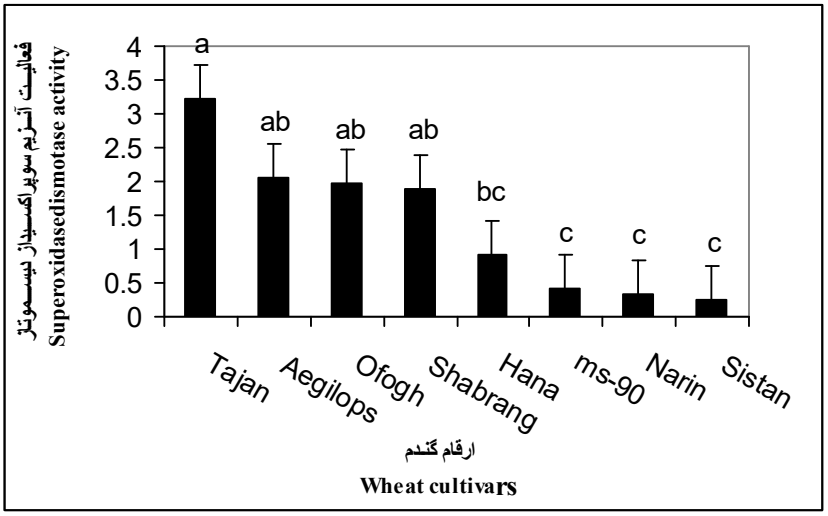


شکل ۴- درصد میکوریزه شدن ارقام مختلف گندم با قارچ ریشه *Glomus intraradices*
(حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می باشد.)
Figure 4- Percentage of root colonization in different wheat cultivars with *Glomus intraradices*.
Same letters in each column represent no significant difference at 5% level by Duncan's test

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 تیمارشده با قارچ ریشه به‌مراتب بیشتر از شاهد بوده است (Esna-Ashari and Bahrami). بالطبع تیمار قارچ ریشه باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در راستای افزایش مقاومت به تنش های زیستی و غیر زیستی خواهدشد. تنش شوری در گیاه باعث کاهش 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 اکسیدانتی 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 (جدول۱).

جدول ۱- آنالیز واریانس داده‌های مربوط به سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی فنل اکسیداز در ارقام مختلف گندم در پاسخ میکوریزی
Table1- 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	سوپر اکسیداز دیسموتاز Superoxide dismutase	درجه آزادی Df	
0.006**	0.070*	3*	7	تیمار Treatment
0.0003	0.021	0.0016	16	خطا Error
231	7	6		ضریب تغییرات(٪) C.V



شکل ۵- تغییرات آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ارقام مختلف گندم تیمار شده با قارچ ریشه.
(حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار 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

میزان تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاهان تیمار شده با قارچ ریشه در شکل ۵ مشاهده می‌شود.

بیشترین میزان این تغییر در رقم تجن مشاهده گردید که یکی از ارقام مدرن گندم نان می‌باشد. این رقم نسبت به بیماری بلایت خوشه گندم حساس است و مشاهدات نشان داده است که کاربرد کودهای زیستی و مواد تقویت‌کننده رشد قادر به ایجاد مقاومت به بیماری گردیده است (Ghazimohseni *et al.*, 2014; Kermanizadeh, 2016). آنالیز واریانس داده های حاصل از فعالیت آنزیمی نشان داد که تفاوت معنی‌داری مابین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام میکوریزی شده آژیلوپس، افق و شبرنگ دیده نمی‌شود. همچنین تفاوتمعنی‌داری در فعالیت این آنزیم در ارقام میکوریزی شده نارین و هانا نیز دیده نمی‌شود. با اینحال فعالیت آنزیم در سایر ارقام میکوریزی شده تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند.

جدول ۲- آنالیز آماری t-test مربوط به ارتباط میانگین فعالیت آنزیم پلی‌فنل 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, Preoxidase and Superoxide dismutase enzyme activity in different wheat cultivars treated with mycorrhiza.

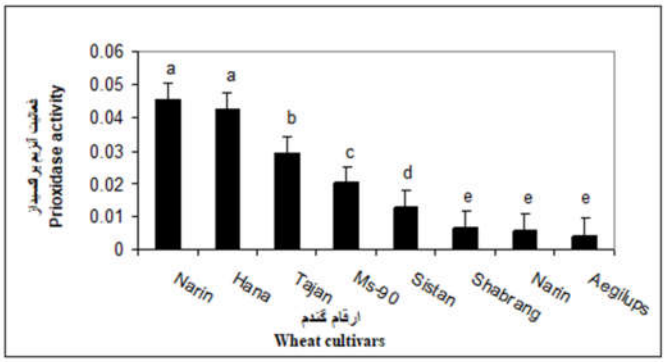
ارقام Cultivar	برابری واریانس Equal of Variance	پلی فنل اکسیداز Polyphenoloxidase			پراکسیداز Proxidase			سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase		
		t	df	Mean difference	t	df	Mean difference	t	df	Mean difference
Aegilops	Equal	0.012	4	0.0373	4.018	4	$0.136^{a,b}$	5.046	4	$2.042^{a,b}$
	unequal	0.078	2.011		4.068	2.053		4.096	2.003	
Ofogh	Equal	0.0104	4	0.0676	2.022	4	0.080	1.009	4	$0.89^{a,b}$
	unequal	0.0706	2.024		2.022	2.001		1.002	2	
Narin	Equal	0.0032	4	0.0143	9.095	4	$0.0240^{a,b}$	3.078	4	3.007^{a}
	unequal	0.0019	2.009		9,007	3.002		3.070	2. 003	
Tajan	Equal	0.0056	4	0.0283	1.008	4	0.003	0.079	4	$0.00076^{a,b}$
	unequal	0.0041	2.003		1.002	2.005		0.070	3	
Sistan	Equal	2.911	4	0.0873^{a}	15.006	4	$0.0296^{a,b}$	2.050	4	$2.0003^{a,b}$
	unequal	2.007	2.005		15/001	2		2.0021	4.027	
Shabrang	Equal	0.087	4	0.0143	13.004	4	$0.466^{a,b}$	4.0021	4	$1.0042^{a,b}$
	unequal	0.059	2.012		13.001	2		4.0003	3.0003	
Hana	Equal	0.069	4	0.0409	21.078	4	$0.0373^{a,b}$	0.0012	4	1.0004^{b}
	unequal	0.046	2.001		21.007	2.013		0.0003	2.001	
Ms-90	Equal	2.789	4	0.0677^{a}	0.0019	4	0.00165	0.0004	4	$0.00013^{a,b}$
	unequal	2.780	2.071		0.0008	2.016		0.0001	2	

حرف a نشانه معنی‌داری تفاوت میانگین‌ها در صورت تساوی واریانس‌ها و حرف b در حالت عدم تساوی واریانس‌ها در سطح خطای ۵٪ می‌باشد.
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.

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).

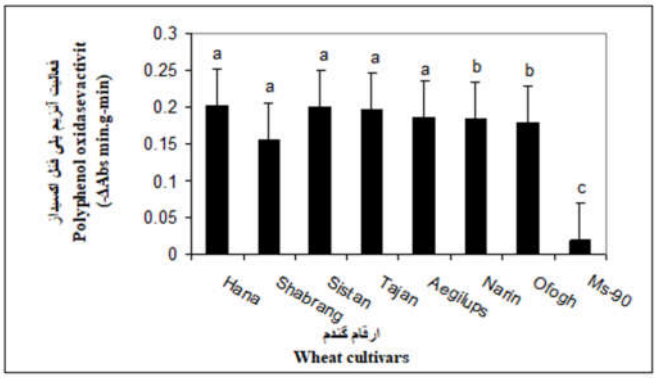
کمترین میزان آنزیم در ارقام سیستان، نارین و ms-90-15 مشاهده گردید. رقم آژیلوپس که یک رقم دیپلوئید می‌باشد و درصد کلونیزه شدن بیشتری را نشان داد با کمی اختلاف در رده دوم افزایش آنزیم قرار گرفت. با توج به نقش کلیدی این آنزیم در بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در حالت میکوریزی و نقش قارچ ریشه‌ها در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان مختلف در مواجهه با تنش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری، کاربرد قارچ ریشه باعث افزایش میزان قابل‌توجهی از انواع مختلف آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی 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 آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالز شده است (Khalafallah and Abo-Ghalia, 2008) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

علاوه بر این نقش این قارچها و تاثیر بر فعالیت فیزیولوزیکی گیاهان از طریق تغییر در منابع غذایی در گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در گیاه پسته کاربرد قارچ ریشه بهمراه 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).



شکل ۶- فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام گندم تحت تیمار میکوریز. حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 6- Proxidase 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 نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

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

این نتایج نشان‌دهنده پاسخ فیزیولوژیک مثبت تمام ارقام به قارچ ریشه می‌باشد که با توجه به نقش آنزیم در افزایش فعالیت‌های مقاومتی، می‌توان به کاربرد قارچ ریشه در برخورد با تنش‌های زنده نظیر عوامل بیماری‌زا امیدوار بود. وابستگی واریته‌های مختلف گندم از تیپ وحشی تا مدرن به گونه‌های مختلف قارچ ریشه حاکی از تنوع بسیار بالای این همزیستی در ژنوتیپ های مختلف گندم می‌باشد به‌طوری‌که حتی در رقم های وحشی دیپلوئیدی هم، درصد میکوریزه شدن و وابستگی میکوریزی متغیر می‌باشد. بررسی میکوریزه شده رقم دیپلوئید *Triticum monoccocum (*A Genome) نشان داده است که علی‌رغم 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 استکه 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 واریته 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 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 ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این تحقیق بررسی پاسخ میکوریزی چند ژنوتیپ مختلف گندم به قارچ ریشه *Glomus intraradice*s در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه میکروسکوپی نشان داد که ژنوتیپ هایی که دارای سری‌های کروموزومی کمتری بودند (ژنوتیپ وحشی و دیپلوئید) میزان پذیرش قارچ ریشه نسبت به ارقام هگزاپلوئید بیشتر بود که این می‌تواند ناشی از نیاز مبرم 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 می‌باشد. با توجه به اینکه میکوریزه شدن می‌تواند ریشه گیاه را در برابر عوامل میکروبی مضر محافظت کند، به طور غیرمستقیم قادر خواهد بود عملکرد محصول را افزایش دهد؛ بنابراین توصیه می‌شود با استفاده از فلور میکروبی ریشه ارقام وحشی گندم گونه‌هایی میکوریزی جدید و قوی‌تر جداسازی و تأثیر آنها بر ارقام زراعی مورد ارزیابی قرار و در تهیه کودهای بیولوژیک مورداستفاده قرار گیرد.

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 Omidi, 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 Masfaraud, 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 (*glumos 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., Esmaeilzadeh 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., Grønlund, 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 EsmaeilZadeh, 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-Ardakani[1], Marziyeh Taheri[1], Hamid Reza Bolok-Yazdi[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Yazd University, Yazd, Iran
[2]Department 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 interaradices* 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