بررسی اثر قارچ میکوریزا آربسکولار *Glomu. intraradices* در بهبود اثر تنش سرمازدگی در گیاهچه های هندوانه *Citrullus lanatus* براساس شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

سیامک شیرانی بیدآبادی[۱] ، محمد مهرعلیان[۲*]
[۱]گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
[۲]گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران،
[*]نویسنده مسئول: mo.mehralian@mail.sbu.ac.ir

چکیده

در این پژوهش اثرات مثبت همزیستی قارچ مایکوریزا آربسکولار *Glomu. Intraradices* بر رشد و صفات فیزیولوژیکی و صفات بیوشیمیایی هندوانه (*Citralus. lanatus*) رقم های crimson sweet وcharleston gray در واکنش به مدت تنش سرمایی ۰ ، ۱۲ و ۳۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه های هندوانه ی تلقیح شده با قارچ آربسکولار مایکوریزا پس از مواجه با تنش سرمایی وزن خشک اندام هوایی و ریشه های توسعه یافته تری در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند. همزیستی گیاهچه های هندوانه با قارچ آربسکولار مایکوریزا همچنین باعث افزایش معنی داری در محتوای کلروفیل و کارایی فتوسنتز شد. تنش سرمایی به مدت ۳۶ ساعت باعث افزایش نشت یونی برگ در گیاهچه های هندوانه شد و این در صورتی است که تلقیح با قارچ مایکوریزا ، نشت یونی را به مقدار قابل توجهی به ترتیب ۹,۹۱٪ و ۱۱,۵۸٪ در ارقام crimson sweet و charleston gray کاهش داد. این نتایج نشان می دهد که همزیستی با قارچ آربسکولار مایکوریزا می تواند نقش مهمی در افزایش تحمل به سرما در گیاهچه های هندوانه از طریق افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه و همچنین افزایش کارایی فتوسنتزی گردد. همچنین در مجموع صفات اندازه گیری شده تحت تنش سرمایی رقم charleston gray نسبت به رقم crimson sweet به سرما متحمل تر می باشد.

کلمات کلیدی : تنش سرمایی ، هندوانه ، مایکوریزا آربسکولار

مقدمه

هندوانه یکی از محصولات مهم فصل گرم باارزش اقتصادی بالا در سرتاسر جهان بوده و متعلق به خانواده ی کوکوربیتاسه می باشد. (Bates and Robinson, 1995; Westphal *et al*., 2008). دمای مطلوب برای رشد گیاهچه های هندوانه در محدوده ی ۲۰ تا ۳۲ درجه با دمای حداقلی ۱۸ درجه و دمای حداکثری ۳۵ درجه می باشد (Bates and Robinson, 1995). یکی از مهمترین نگرانی ها در پرورش محصولات فصل گرم مواجه با سرمای زودرس بهاره می باشد که ممکن است موجب آسیب شدید به گیاه از طریق کاهش رشد گیاه و کاهش ظرفیت فتوسنتزی ، نشت یونی از غشاهای سلولی ، پژمردگی ، نکروز شدن برگ ها و حتی باعث افزایش حساسیت به بیماری ها و پاتوژن‌ها می‌شود (Sasson and Bramlage, 1981; Kozik, 2014). دمای زیر ۱۰ درجه سانتی گراد ممکن است به گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند اعضای خانواده کوکوربیتاسه آسیب جدی برساند (Sasson and Bramlage, 1981) . کاشت هندوانه در اوایل بهار و پیش از رسیدن به دمای مطلوب ۲۰ تا ۳۰ درجه بدلیل برداشت زودتر از موعد ضروری می باشد.

IrHC2019

ولی در برخی سال ها نوسانات دمایی ممکن است گیاهچه های منتقل شده به مزرعه تحت دماهای متغیر بین دماهای سرمازدگی (۰ تا ۱۰ درجه سانتی گراد) و دمای مطلوب (۲۰ تا ۳۲ درجه سانتی گراد) که تنها طی چندروز رخ میدهد قرار گیرندو تحت تاثیر قرار گیرند. این شرایط بسیار آسیب رسان و مخرب برای رشد و عملکرد هندوانه می باشد و حتی ممکن است باعث مرگ گیاهچه های هندوانه شود (Westphal *et al*., 2008). قارچ آربسکولار مایکوریزا بعنوان میکروارگانیسم های خاکی قابل توجهی می باشد که تقریبا در تمام بوم سازگاری های زراعی وجود دارد و با ریشه ی بیش از ۸۰٪ از کل گونه های گیاهی موجود می تواند همزیستی برقرار کند (Yang *et al*., 2014). همزیستی با قارچ آربسکولار مایکوریزا می تواند رشد گیاه را بهبود ببخشد و در مقابل تنش های زیستی و غیر زیستی بدون هیچ گونه آسیبی برای محیط زیست بقای گیاه را تامین کند (Liu *et al*., 2016). چنین روش زیستی سازگار با محیط زیست و قابل توجه برای تقویت مقاومت گیاه به شرایط تنش زا مورد توجه قرار گرفته است (Maya and Matsubara, 2013).

گزارش شده است که کاربرد تلقیح قارچ های مایکوریزا با ریشه ی گیاه هندوانه برای بهبود استقرار گیاه و افزایش کارایی و عملکرد میوه در هندوانه تحت تنش های محیطی را باعث می شود (Westphal *et al*., 2008). در طول سه دهه ی گذشته تحقیقاتی بر تاثیرات قارچ های آربسکولار مایکوریزا بر رشد و فیزیولوژی گیاه تحت تنش های دمایی پایین و بالا شده است (Zhu *et al*., 2017). استفاده از قارچ آربسکولار مایکوریزا بعنوان یک روش قابل قبول و نوید دهنده برای کاهش اثرات نامطلوب سرمای زودرس بهاره بر کشت هندوانه می باشد. تا کنون بررسی منابعی در مورد اثرات کاهش دهنده قارچ مایکوریزا برروی گیاه هندوانه در معرض تنش سرمایی وجود ندارد. بنابراین هدف این مطالعه آشکار سازی نقش حیاتی همزیستی قارچ مایکوریزا آربسکولار در افزایش تحمل به سرما در نهال های هندوانه می باشد.

مواد و روش ها

بذر های هندوانه از شرکت دلتای سبز جنوبی در سال ۲۰۱۶ تهیه شدند. مایه تلقیح شامل قارچ مایکوریزا آربسکولار (*Glomu. Intraradices*) تقریبا شامل ۲۵ اسپور بر گرم (که پیش از تحقیق توسط میکروسکوپ الکترونی شمارش شد)، ماسه و اجزای ریشه ی یونجه (*Medicago scutellata* L.) توسط شرکت زیست فناور توران (شاهرود-ایران) فراهم شد.مقدار دوز مایه کوبی شده ۲۰ گرم از مایه تلقیح در هر گلدان بود.بذر ها با سدیم هیپوکلریت ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند و درون سینی نشا در بستر کوکوپیت پرلیت به ترتیب به نسبت (۱:۲) و در دمای ۲۵ درجه پس از گذشت ۱۵ روز به گلدان های (۲۰۰ میلی لیتری) کوچک انتقال داده شدند(یک گیاهچه در هر گلدان). هر گلدان با ۱۵۰ گرم پیت ماس به همراه ۲۰ گرم مایه تلقیح قارچ مایکوریزا یا وزن یکسانی از مایه ی تلقیح اتوکلاو شده (جهت تیمار شاهد) پر گردید. مایه ی تلقیح مایکوریزا مستقیما در تماس مسقیم با ریشه های گیاهچه ها قرار داده شد. گلدان های آزمایش در گلخانه با دمای میانگین ۲۰/۲۸ درجه سلسیوس به ترتیب روز و شب با شدت نور ۱۵ کیلو لوکس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار داده شد تا گیاهچه های نرمال و یکنواختی حاصل شود که مناسب برای بررسی تیمار های تنش باشد (تصویر ۱). پس از کلون شدن هیف های قارچ مایکوریزا در سطح ریشه به مدت سه هفته تیمار تنش سرمایی اعمال شد. پس از اینکه در گیاهچه ها دومین برگ حقیقی ظاهر شد بطور یکنواخت گیاهچه هایی که تحت شرایط محیطی کنترل شده در اتاقک سرمایی در دپارتمان کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان بودند بررسی شدند. تست های تنش سرمایی توسط روش بیان شده برای گیاهچه های هندوانه توسط Kozik (2014) به اتاقک های سرمایی در دمای ۴±۰,۵ درجه طی مدت ۱۲ و ۳۶ ساعت انتقال داده شدند . برای آزمایش برخی گلدان ها در شرایط نرمال بعنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شدند.بعداز تیمار های سرمایی گلدان ها به شرایط گلخانه ای برگردانده شدند و

IrHC2019

در شرایط نوری و دمایی یکسان مشابه قبل قرار گرفتند. تمامی شاخص های مورد بررسی بعد از دو هفته از سپری شدن تنش سرمایی مورد بررسی قرار گرفتند.

ویژگی های رشدی(شامل وزن خشک ریشه و اندام هوایی):

گیاهچه های هر تیمار با دقت از خاک جدا شده و به آرامی با آب شستشو داده تا ذرات گل و لای چسبیده جداشوند. سپس ریشه ها و شاخساره ها در آون در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت جهت تعیین میزان وزن خشک قرار گرفتند.

مقدار کروفیل نسبی برگ(RLCC)، کلروفیل فلورسانس، غلظت پرولین و تعیین نشت یونی برگ:

کلروفیل نسبی با دستگاه کلروفیل سنج پرتابل (SPAD 502, Minolta Co., Osaka, Japan) اندازه گیری شد. کارایی فتوسنتز (Fv/Fm) توسط دستگاه فلورومتر (Walz, Effeltrich, Germany) پس از ۳۰ دقیقه سازگاری در تاریکی اندازه گیری شدند. نسبت Fv/Fm به صورت زیر محاسبه گردید:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

که Fm و F0 به ترتیب نشان دهنده ی بیشترین و کمترین بازده سازگاری برگ ها با تاریکی می باشد. غلظت پرولین توسط گزارش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین گردید. نشت یونی (EL) بوسیله ی یک هدایت سنج طبق روش Ozden و همکاران (۲۰۰۹) اندازه گیری شد. نمونه ها به دو قسمت برابر تقسیم شدندکه شامل ۱۵ میلی لیتر آب مقطر بود و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. هدایت الکتریکی اولیه محلول توسط هدایت سنج اندازه گیری شد. تیوب‌ها در دمای ۱۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شدند و هدایت الکتریکی نهایی محلول با اتوکلاو شدن و انکوباته شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق انجام شد. درصدبا استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{EL (\%)} = \frac{\text{The initial conductance of the solution}}{\text{The final conductance of the solution}} \times 100$$

آنالیز آماری

این پژوهش براساس آزمایش فاکتوریل بر اساس طرح کاملا تصادفی (ارقام، مدت زمان تنش سرمایی) و عمل تلقیح به عنوان فاکتور های اصلی آنالیز شدند هر تیمار شامل سه تکرار و تفاوت ها در شاخص های مرفولوژیکی فیزولوژیکی و بیوشیمیایی با آنالیز واریانس (Anova) توسط برنامه SAS و MATAT-C بررسی شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۰،۰۵ بررسی شد.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی و ریشه های گیاهچه های تلقیح شده با قارچ مایکوریزا آربسکولار در مقایسه با گیاهچه های شاهد به ترتیب در رقم crimson sweet ۱۴،۷٪ و ۲۷٪ و در رقم charleston gray ۳۳،۷٪ و ۲۴٪ افزایش یافت.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه در رقم crimson sweet به ترتیب تا ۲۶،۹ ٪ و ۴۲،۹٪ و در رقم charleston gray به ترتیب تا ۳۱،۲٪ و ۴۲،۱٪ تحت دمای سرمایی ۳۶ ساعت نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت(جدول۱). تلقیح با قارچ مایکوریزا آربسکولار بطور مشخصی باعث افزایش نسبت فلورسانس کلروفیل Fv/Fm در ساعات مختلف تنش سرمایی شد. در این مطالعه نسبت Fv/Fm تا ۲۴٪ و ۳۷٪ به ترتیب در گیاهچه های تلقیح شده با قارچ مایکوریزا آربسکولار در ارقام crimson sweet وcharleston gray نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. ساعت های تنش سرمایی

IrHC2019

باعث افزایش نشت یونی برگ شد، بیشترین افزایش نشت یونی در زمان ۳۶ ساعت تنش سرمایی رخ داد در حالی که تلقیح با قارچ مایکوریزا آربسکولار نشت یونی را به ترتیب در ارقام crimson sweet وcharleston gray تا ۹,۹۱٪ و ۱۱,۵۸٪ زمانی که تنش سرمایی به مدت ۳۶ ساعت اعمال شد بهبود بخشیده شد(جدول۲). با افزایش زمان تنش سرمایی غلظت پرولین افزایش زیادی نشان داد اما این افزایش زمانی بیشتر نشان داده شد که از تلقیح با قارچ مایکوریزا آربسکولار استفاده شد، در عین حال تلقیح با قارچ مایکوریزا آربسکولار در گیاهچه هایی که تحت تنش سرمایی قرار نگرفتند منجر به تغییرات زیادی در مقدار پرولین نشد. تحت تنش سرمایی ویژگی های مورفولوژیکی گیاه تاثیرات منفی میگیرد و رشد گیاه و زیست توده به طور قابل توجهی کاهش می یابد. یک روش موثر برای بهبود تحمل گیاهان در برابر تنش سرمایی همزیستی با قارچ مایکوریزا آربسکولار میباشد. تاثیرات مثبت همزیستی قارچ مایکوریزا آربسکولار در رشد و افزایش زیست توده گیاهچه های هندوانه در مطالعه حاضر مشاهده شد. نتایج نشان داد که گیاهچه های هندوانه ی تلقیح شده با قارچ مایکوریزا آربسکولار که در معرض تنش سرمایی قرار گرفتند رشد بهتری نسبت به گیاهچه هایی که تلقیح نشده، نشان دادند. وقتی گیاهان در معرض تنش سرمایی قرار می گیرند خیلی فرایند ها و فعالیت های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختل خواهد. نتایج نشان داد که گیاهچه های هندوانه ی تلقیح شده با قارچ مایکوریزا آربسکولار باعث حفظ غلظت بالای الکترولیتی نسبت به گیاهچه های تلقیح نشده با قارچ مایکوریزا آربسکولار با حفظ بهبود نشت الکترولیتی غشا می گردد. در عین حال Zhu و همکاران(۲۰۱۰) ادعا کردند که نشت یونی برگی در ذرت تلقیح شده با قارچ مایکوریزا تنش سرمایی کمتر از ذرت های تلقیح نشده با مایکوریزا بود که بطور واضح به همزیستی قارچ مایکوریزا آربسکولار اشاره دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۱ وزن خشک اندام هوایی و ریشه های گیاهچه های تلقیح شده با قارچ مایکوریزا آربسکولار در مقایسه با شاهد

Cult.	Inoculation	Chilling stress (h)	Shoot dry weight	Root dry weight
"Crimson Sweet"	+M	0	2.45 ^{b}	0.27 ^{b}
		12	1.37 ^{ef}	0.20 ^{cd}
		36	1.04 ^{fg}	0.14 ^{ef}
	−M	0	2.09 ^{c}	0.20 ^{cd}
		12	1.06 ^{fg}	0.15 ^{def}
		36	0.76 ^{g}	0.08 ^{g}
"Charleston Gray"	+M	0	2.94 ^{a}	0.37 ^{a}
		12	2.16 ^{bc}	0.25 ^{bc}
		36	1.25 ^{f}	0.19 ^{de}
	−M	0	1.95 ^{cd}	0.28 ^{b}
		12	1.67 ^{de}	0.19 ^{de}
		36	0.86 ^{g}	0.11 ^{fg}
	LSD $_{(0.05)}$		0.34	0.06

IrHC2019

جدول ۲ نسبت فلورسانس کلروفیل Fv/Fm ، مقدار کروفیل نسبی برگ(RLCC) و نشت یونی(EL)

Cult.	Inoculation	Chilling stress (h)	RLCC	F_v/F_m	EL
"Crimson Sweet"	+M	0	46.69 ^{a}	0.91 ^{a}	3.80 ^{g}
		12	39.82 ^{bc}	0.71 ^{c}	14.43 ^{e}
		36	26.48 ^{fg}	0.50 ^{e}	29.47 ^{c}
	−M	0	36.89 ^{cd}	0.89 ^{a}	8.10 ^{f}
		12	29.60 ^{ef}	0.63 ^{d}	19.07 ^{d}
		36	21.41 ^{h}	0.38 ^{f}	39.30 ^{a}
"Charleston Gray"	+M	0	49.17 ^{a}	0.92 ^{a}	4.00 ^{g}
		12	35.06 ^{d}	0.79 ^{b}	12.67 ^{e}
		36	28.38 ^{efg}	0.60 ^{d}	28.50 ^{c}
	−M	0	41.80 ^{b}	0.89 ^{a}	7.70 ^{f}
		12	30.56 ^{e}	0.70 ^{c}	17.63 ^{d}
		36	25.16 ^{g}	0.38 ^{f}	34.77 ^{b}
	LSD $_{(0.05)}$		3.44	0.04	2.97

شکل ۱- (+M) تلقیح مایکوریزا و (-M) عدم تلقیح مایکوریزا گیاهچه های هندوانه آماده جهت انتقال به ساعت های تنش سرمایی

IrHC2019

منابع

Bates M.D. and Robinson R.W., 1995. Cucumbers, melon, and watermelons, p. 89- 97. In: SMART J., SIMMONDS N.W., eds. Evolution of crop plants. 2nd Ed. Longman Scientific and Technical, Essex, England.

Kozik E.U., 2014. Tolerance of watermelon seedlings to low-temperature chilling injury. HortScience, 49 (3): 240- 243.

Liu A., Chen S., Wang M., Liu D., Chang R., Wang Z., Lin X., Bai B. and Ahammed G.J., 2016. *Arbuscular mycorrhizal* fungus alleviates chilling stress by boosting redox poise and antioxidant potential of tomato seedlings. J. Plant Growth Regul, 35: 109- 120.

Maya M.A., Matsubara Y., 2013. Influence of *arbuscular mycorrhiza* on the growth and antioxidative activity in cyclamen under heat stress. Mycorrhiza, 23: 381–390.

Ozden M., Demirel U. and Kahraman A., 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2. Sci Horticult., 119: 163- 168.

Sasson N. and Bramlage W., 1981. Effects of chemical protectants against chilling injury of young cucumber seedlings. J. Amer. Soc. Hort Sci., 106: 282- 284.

Westphal A., Snyder N.L., Xing L. and Camberato J.J., 2008. Effects of inoculations with mycorrhizal fungi of soilless potting mixes during transplant production on watermelon growth and early fruit yield. HortScience, 43 (2): 354- 350.

Yang Y., Tang M., Sulpice R., Chen H., Tian S. and Ban Y., 2014. *Arbuscular mycorrhizal* fungi alter fractal dimension characteristics of *Robinia pseudoacacia* L. Seedlings through regulating plant growth, leaf water status, photosynthesis, and nutrient concentration under drought stress. J. Plant Growth Regul, 33: 612–625.

Zhu X., Song F. and Liu F., 2017. *Arbuscular mycorrhizal* fungi and tolerance of temperature stress in plants. In WU Q.S., ed. *Arbuscular mycorrhizas* and stress tolerance of plants. Springer Nature Singapore, Pte Ltd., doi 10.1007/978-981-10-4115-0_8.

Arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* improves chilling stress in watermelon seedlings *Citrullus lanatus*

Siamak Shirani Bidabadi,[1] Mohammad Mehralian[2,*]

[1] Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

[2] Department of Agriculture, medicinal plant Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[*]*Corresponding Author: mo.mehralian@mail.sbu.ac.ir*

Abstract

The positive effects of *Glomus intraradices* symbiosis on the growth, physiological and biochemical attributes of watermelon (*Citrullus Lanatus*) cv. "Crimson Sweet" and "Charleston Gray" in response to chilling stress hours were investigated. When subjected to chilling stress, AMF- inoculated watermelon seedlings exhibited significantly higher root and shoot dry mass than non-AMF-inoculated plants. AMF symbiosis also improved chilling stress in watermelon seedling via alterations in chlorophyll content and photosynthesis efficiency .Chilling stress hours enhanced leaf electrolyte leakage of watermelon seedlings, while inoculation of AMF significantly ameliorated EL by 9.91 and 11.58 % in "Crimson Sweet" and "Charleston Gray", respectively under 36 hours of Chilling stress. These results indicated that AMF

IrHC2019

symbiosis could play an important role in improving chilling tolerance of watermelon seedlings by restoring photosynthesis efficiency and relieving chilling stress effects.

Keywords: Low temperature stress, mycorrhiza arbuscular, Symbiosis fungus

11th IrHC 2019
IrHC2019