نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۲۹۳-۲۸۶

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 3, Fall 2013, P. 286-293

ارزیابی مقاومت ایجاد شده توسط قارچهای مایکوریزی آربوسکولار(AMF) علیه نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne javanica*) در گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

مرتضی قربانی[۱*]- حمید روحانی[۲] - عصمت مهدیخانی مقدم[۳] - یونس رضائی دانش[۴] - امین میرشمسی[۵]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۲/۲۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۳/۳۰

چکیده

در این تحقیق تاثیر همزیستی دو گونه *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* از قارچهای مایکوریزی آربوسکولار بر بیماری نماتدی گره ریشه با عامل *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت و در تیمارهای مختلف، اثرات ناشی از برهم کنش این دو میکروارگانیزم، برشاخص های رشدی گیاه ، شاخص های بیماری نماتدی و شاخص های توسعه مایکوریزی ارزیابی شدند. آزمایشها در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شدند و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. در مورد شاخص های رشدی، وزن تر و خشک اندامهای هوایی و ریشه بررسی شدند که افزایش در وزن اندامهای هوایی در تیمارهای حاوی مایکوریز و افزایش در وزن ریشه در تیمارهای نماتدی مشاهده گردید، که این تغییرات می تواند ناشی از تحریک رشد گیاه و نیز القای مقاومت علیه نماتد توسط قارچ و نیز افزایش حجم ریشه به دلیل تولید گال باشد، در زمینه شاخص های رشدی گیاه تیمارهای حاوی گونه *G. mosseae* نسبت به تیمارهای حاوی *G. intraradices* افزایش معنی داری در زمینه وزن اندامهای هوایی و کاهش معنی داری در زمینه وزن ریشه نشان می دهند که می تواند ناشی از نقش موثرتر گونه G. mosseae در تحریک رشد گیاه و القای مقاومت علیه نماتد باشد. در مورد شاخص های بیماری نماتدی تیمارهای حاوی قارچ مایکوریز کاهش معنی داری را نسبت به تیمار نماتد نشان می دهند که نشان دهنده کاهش حمله و جلوگیری از تولید مثل نماتد است و در مجموع ایجاد مقاومت به بیماری توسط دو گونه قارچی را اثبات می کند اما مقایسه این شاخص ها بین دو گونه قارچی نشان می دهد که گونه *G. mosseae* نقش موثرتری در کنترل بیماری ایفا می کند. درمورد شاخص فراوانی مایکوریزی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد نماتد گرهی ریشه تأثیر منفی بر روی این شاخص نمی‌گذارد و مانع از توسعه مایکوریزی نمی‌گردد. درمورد شاخص تراکم مایکوریزایی مشاهده می‌کنیم که بین دو تیمار *G.mosseae* و *G.intraradices* تفاوت معنی‌داری وجود دارد و گونه *G.mosseae* دارای توانایی کلنیزاسیون بالاتری در رقم گوجه-فرنگی موردآزمایش می‌باشد و می‌توانیم نتیجه‌گیری کنیم که توانایی پایین گونه *G.intraradices* در کنترل سایر شاخص‌های نماتدی نیز ناشی از پایین بودن درصد کلونیزاسیون است. در مجموع نتایج این آزمایش نشان دهنده اینست که می توانیم از قارچهای مایکوریزی آربوسکولار به عنوان یک عامل کنترل زیستی در مهار بیماری نماتدی گره ریشه و نیز جهت افزایش عملکرد گیاه گوجه فرنگی استفاده کنیم.

واژه های کلیدی : قارچهای مایکوریزی آربوسکولار، نماتد ریشه گرهی، گوجه فرنگی، مقاومت

مقدمه

قارچهای مایکوریزی آربوسکولار یا AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) جزو قارچهای مایکوریز داخلی یا اندو مایکوریز می باشند. ارتباط همزیستی گیاهان با این قارچها بیش از ۴۰۰ میلیون سال قدمت دارد. این همزیستی در چرخه رویشی و تولید مثلی بیشتر گیاهان خشکی زی به ویژه در شرایط تنش اهمیت زیادی دارد. این قارچها دارای میسلیوم فاقد جدار عرضی می‌باشندو به صورت درون سلولی و بین سلولی در پوست ریشه رشد می کنند. این قارچها به ندرت به صورت آزاد دیده می‌شوند و اکثر آنها قادر به رشد روی محیط های مصنوعی نمی باشند. ریسه های خارجی آنها تا چند سانتیمتر اطراف ریشه پراکنده اندو ریسه های داخلی به فضای بین

۱ - دانشجوی سابق دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه زابل
(*- نویسنده مسئول: Email: mghorbany@uoz.ac.ir)
۲ و۳- استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۵- استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

سلولی میزبان گیاهی نفوذ کرده و عمدتاً اندام‌های مکنده منشعب به نام آربوسکول (Arbuscule) را در داخل سلول و وزیکول‌های ذخیره ای را در داخل و یا خارج سلول میزبان تشکیل می‌دهند. بیشتر این قارچها تشکیل اسپور و یا اسپوروکارپ‌هایی با ساختمان پیچیده می‌دهند. قارچهای مایکوریز آربوسکولار باعث بهبود وضعیت تغذیه گیاه به خصوص جذب بالای فسفر می گردند که در نتیجه رشد گیاه و میزان محصول افزایش می یابد و از طرف دیگر گیاه ترکیبات آلی را در اختیار قارچ قرار می دهد (۲). رشد گیاهان مایکوریزی در تنش‌های محیطی مانند کمبود مواد غذایی، سمیت خاک و PH نامناسب خاک از گیاهان غیر مایکوریزی بیشتر است و نسبت به این شرایط مقاومت بیشتری نشان می دهند. نماتدهای پارازیت گیاهی یکی از وسیعترین پاتوژنهای گیاهی هستند که سالانه حدود یکصد میلیارد دلار خسارت ایجاد می کنند در این میان نماتدهای پارازیت داخلی غیر مهاجر مولد گره (*Meloidogyne* spp) بیشترین نقش را دارند و اکثر گیاهان گلدار را آلوده می کنند (۲۳). این نماتدها متعلق به راسته *Tylenchida* ، زیر راسته *Tylenchina*، بالا خانواده *Tylenchoidea* ،خانواده *Heteroderidae* و زیر خانواده *Meloidogyninae* می باشند (۲۹). از بین نماتد های ریشه گرهی چهار گونه *M.incognita* ، *M.javanica* ، *M.arenaria* و *M.hapla* از سایر گونه ها مهمترند و ۹۵ درصد آلودگیهای نماتدی در خاکهای کشاورزی را ایجاد می کنند (۱۴ و ۲۸). خسارت ناشی از نماتد گرهی ریشه به دلیل تنش آبی ایجاد شده در اثر شکستگی و قطع بافت آوندی در ناحیه تغذیه نماتد است همچنین آلودگی نماتدی باعث تغییر شکل سیستم ریشه می‌شود که مانع از توسعه ریشه به طرف خاک مرطوب می‌گردد (۱۴). تأثیرات فیزیولوژیکی کاهش دسترسی به آب شامل کاهش جذب مواد مغذی و انتقال مواد محلول است. همچنین کاهش نرخ فتوسنتز نیز در اثر بیماری گزارش شده است (۲۱ و ۲۲). نماتدهای ریشه گرهی گیاهان را جهت حمله سایر عوامل بیماریزا مستعد می‌کنند و افزایش حساسیت به پاتوژنهای قارچی و باکتریایی پس از آلودگی نماتدی گزارش شده است (۴ و ۲۵). کنترل نماتد مولد گره به خاطر دامنهٔ میزبانی وسیع، دوره‌های نسلی کوتاه و نرخ بالای تکثیر با مشکلات خاصی روبرو می‌باشد (۳۶). روشهای کنترل نماتدها را می‌توان به ۳ گروه شیمیایی، زراعی و بیولوژیک تقسیم‌بندی کرد. امروزه به دلیل نگرانی‌های فرایند زیست‌محیطی سعی براینست تا گزینه‌های شیمیایی محدودتر شوند (۳۷).

در حال حاضر کنترل بیولوژیک نماتدها با استفاده از میکروارگانیزم‌های ریزوسفر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است تا به عنوان یک روش مدیریتی جایگزین مؤثری برای نماتد کش‌ها باشد (۱۵). جهت کنترل زیستی این نماتدهای پارازیت، میکروارگانیزم‌های متنوعی گزارش شده‌اند که از آن‌جمله می‌توان از ریزوباکتریاهای افزایش دهنده رشد گیاهان (۳۲ و ۳۴) پارازیت کننده های باکتریایی (۳۳)، پارازیت‌های قارچی (۱۶) رقبایی از جمله اندوفیت‌های قارچی (۶) و همچنین قارچهای مایکوریزی نام برد (۷). اگرچه کنترل بیولوژیک نماتدها با استفاده از میکروارگانیزمهای رایزوسفر می‌تواند نویدبخش کاهش مصرف سموم باشد، اما این نوع کنترل در شرایط عملی با مشکلاتی روبه‌رو است که مهار آنها آسان نیست و به دلیل وجود جمعیت‌های متنوع میکروبی در خاک ایجاد یک میکروفلور جدید مشکل است (۳۵). در بین عوامل کنترل بیولوژیک آنهایی که می‌توانند همزمان با نماتدها بر روی ریشه فعالیت کنند مورد تأیید بیشتری قرار دارند. قارچهای مایکوریزی آربوسکولار و نماتدهای مولد گره دارای یک وجه اشتراک بسیار مهم هستند که توانایی آنها برای همراه بودن با ریشهٔ بخش عمده‌ای از گونه‌های گیاهی است درحالی‌که سایر بیوتروف‌ها به‌طور عمده دامنهٔ میزبانی محدودی دارند (۳۶). تاکنون تحقیقات متعددی در مورد بهره گیری از قارچهای مایکوریزی آربوسکولار جهت کنترل بیماریهای گیاهی انجام شده است .کم کردن و تعدیل خسارت ناشی از پاتوژنهای خاکزاد به طور وسیعی در گیاهان مایکوریزی گزارش شده است. اکثر مطالعات بر روی محافظت توسط AM بر کاهش مقدار و شدت بیماری های خاکزاد خصوصا پوسیدگی ریشه یا پژمردگی ایجاد شده توسط قارچهایی مانند *Verticillium*، *Fusarium*, *Rhizoctonia* و پوسیدگی ریشه ناشی از قارچهای اوومیست مانند *Pythium*, *Phytophthora* و *Aphanomyces* دلالت می‌کند (۳۹).گزارشی در مورد کاهش تاثیرات مضر نماتدهای پارازیت مانند *Pratylenchus* و *Meloidogyne* ارائه شده است (۵ و ۱۸) مانند هر عامل بیوکنترل دیگری قابل ذکر است که توانایی افزایش مقاومت یا تحمل در بین ایزوله های AMF متفاوت است و همچنین این نوع محافظت در مورد تمامی پاتوژنها موثر نیست و حفاظت با شرایط محیطی تنظیم می گردد (۵ و ۸). گزارش ها در مورد تاثیر مایکوریزها بر روی بیماریهای اندامهای هوایی کمتر بوده و قاطعیت ندارند. همزیستی AM باعث افزایش حساسیت به پاتوژنهای بیوتروف (اجباری) از جمله ویروسها (۹) سفیدکهای پودری و قارچهای زنگ می‌شود. مانند جنس های *Uromyces,Blumeria* اما در دوره‌های انبارداری و برداشت اغلب افزایش تحمل مشاهده می شود (۳۹). همزیستی مایکوریزی اما باعث کاهش علائم بیماریهای ناشی از فیتوپلاسما و حفاظت در مقابل عامل نکروتروف *Alternaria solani* در گوجه فرنگی می شود (۹ و ۱۹). اخیراً تاثیر AM بر روی روابط متقابل گیاه و باکتریهای پاتوژن اندامهای هوایی (شاخ و برگ) توسط پوزو و همکاران (۲۰) ارزیابی شده است و نتیجه گرفته اند که همزیستی مایکوریزی باعث افزایش مقاومت به *Xanthomonas campestris* در *Medicago truncatula* و *Pseudomonas syringae* در گوجه فرنگی ها می شود. در این تحقیق تاثیر

همزیستی دو گونه از قارچهای مایکوریز آربوسکولار بر بیماری نماتدی گره ریشه با عامل *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه و تکثیر مایه تلقیح (مایه تلقیح) قارچی

در این آزمایش یک ایزوله از گونه قارچی *Glomus mosseae* Trappe &gere و یک ایزوله از گونه قارچی *Glomus intraradices N.C.Schenck&G.S.Sm.* از بخش گیاه پزشکی دانشگاه ارومیه دریافت شد و جهت انجام مراحل مختلف آزمایش تکثیر گردید. به دلیل بیوتروف بودن قارچهای مایکوریزی جهت تکثیر مایهٔ تلقیح اسپور قارچها از کشت‌های گلدانی تله[1] استفاده شد. به این منظور مایه تلقیح اولیه هر ایزوله قارچی را به نسبت ۳۰ درصد، با محیط پایه (مخلوط ۲ به ۱ شن و خاک استریل) مخلوط و این نمونه های مخلوط شده را در ظروف کوچک پلاستیکی (لیوان‌های یکبار مصرف) بعنوان گلدان ریختیم. گیاه شبدر رقم برسیم بعنوان گیاه تله در این مطالعه انتخاب شد . بذور شبدر توسط هیپوکلریت سدیم ۲ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر ضد عفونی سطحی شده و در مرحله بعد چندین بار توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا اثرات کلر از بین برود. در هر ظرف ۶ تا ۸ بذر کشت گردید که پس از جوانه زنی و اندکی رشد، فقط ۳ تا ۴ گیاهچه جهت رشد حفظ شده و مابقی حذف شدند. این ظروف به مدت ۳ هفته در شرایط گلخانه ای مطلوب نگاهداری شدند. پس از این مدت بدون از بین رفتن گیاه، کل محتویات لیوان ها به گلدان های بزرگتر (۳ کیلوگرمی) حاوی مخلوط شن و خاک استریل با نسبت دو به یک منتقل شده و مجدد در شرایط گلخانه ای به مدت ۴ ماه نگاهداری گردیدند. دلیل کشت اول بذور در ظروف کوچکتر و قرار دادن آن ها به مدت ۳ هفته در شرایط گلخانه ای امکان تماس هر چه بهتر و بیشتر قارچ های مایکوریز موجود در نمونه اولیه با بذور و ریشه های جوان گیاه و ایجاد کلنیزاسیون بیشتر و سریعتر توسط قارچ بود و سپس با انتقال گیاه و قارچ به گلدان های بزرگتر فضای کافی جهت توسعه سیستم ریشه ای گیاه میزبان و تکثیربهتر قارچ فراهم می گردد. در مدت این ۴ ماه نگاهداری گیاهان در شرایط گلخانه ای، از مکمل غذایی لانگ اشتون نیز جهت آبیاری گیاهان با فواصل زمانی مشخص (هر هفته یک بار) استفاده شد. پس از ۴ ماه آبیاری گلدان ها، قطع شده و بعد از خشک شدن گیاهان، بخش هوایی آن ها حذف شد و گلدان ها در سایه و به مدت ۲-۳ هفته نگاهداری شدند.

1- Trap culture

قطع اندام هوایی گیاه نیز به منظور تحریک قارچ به تولید اسپور بیشتر می باشد. از مخلوط خاک و ریشه به دست آمده که حاوی اسپور ایزوله های قارچی مورد نظر است به عنوان مایه تلقیح در مراحل بعد استفاده گردید.

تهیه و تکثیر مایه تلقیح نماتدی

ایزوله‌ای از گونهٔ *Meloidogyne javanica* که از مزارع گوجه فرنگی اطراف مشهد جداسازی و تخلیص شده بود پس از انجام مراحل شناسایی مرفولوژیک و مولکولی از بخش گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد. ایزولهٔ مذکور بر روی ریشهٔ گیاه گوجه-فرنگی رقم موبیل به روش کیسه تخم منفرد تکثیر و جهت انجام مراحل بعدی در گلخانه نگهداری شد به این منظور لیوان‌های پلاستیکی (یک بار مصرف) توسط شن الک شده استریل پر شدند و در هر لیوان ۲ عدد بذر گوجه‌فرنگی استریل کشت گردید، زمانی‌که گیاهچه‌ها ۳ برگچه‌ای شدند با کنار زدن شن سطحی یک عدد کیسه تخم در پای طوقه هر گیاه قرار گرفت و به آرامی آبیاری شد. این ظروف به مدت دو هفته در شرایط گلخانه‌ای مطلوب نگهداری شدند و سپس با تمام محتویات جهت توسعه سیستم ریشه‌ای و تکثیر نماتد به گلدان‌های ۳ کیلوگرمی حاوی مخلوط شن و خاک استریل (به نسبت ۲به۱) انتقال یافتند. این گلدانها نیز در گلخانه نگهداری شدند و پس از توسعهٔ آلودگی و ایجاد گره (گال) در ریشه‌ها تخمهای نماتد از ریشه‌های پر از گال با روش Hussey و Barker (1973) استخراج شد.

آماده سازی گیاهان گوجه فرنگی مورد آزمایش

بذور گوجه‌فرنگی رقم موبیل (Mobil) ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر ضدعفونی سطحی شده و بعد از آن چندین‌بار توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس این بذور در سینی‌های نشاء پلاستیکی در بستری از پیت ماس استریل کشت شدند. سینی‌ها هر۲ روز یکبار آبیاری شدند.

آزمایش برهم کنش (Interaction) بین قارچهای مایکوریزی و نماتد مولد گره

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار انجام گرفت، که تیمارها به شرح ذیل درنظر گرفته شدند:

۱- تیمار مایکوریزی *Glomus mosseae* ۲- تیمار مایکوریزی *Glomus intraradices* ۳- تیمار بر هم کنش قارچ و نماتد *G.mosseae/M.javanica* ۴- تیمار بر هم کنش قارچ و نماتد *G.intraradices/ M.javanica* ۵- تیمار نماتدی

Meloidogyne javanica ۶- تیمار شاهد (فاقد مایکوریز و نماتد)

گیاهچه‌های ۳ برگچه‌ای گوجه‌فرنگی پس از خارج کردن از سینی نشاء به گلدانهای پلاستیکی ۳ کیلوگرمی با بستر شن و خاک استریل (با نسبت دو به یک) انتقال یافتند. خاک گلدانها در تیمارهای ۱ تا ۴، قبل از انتقال گیاهچه‌ها به نسبت ۳۰درصد با مایه تلقیح قارچی مربوط مخلوط گردید پس از گذشت ۱۴روز در تیمارهای ۴،۳ و۵ مایه تلقیح نماتدی به میزان ۵۰۰ تخم برای هر گیاه با کنار زدن خاک، پای طوقه گیاه اضافه گردید. و در مورد سایر تیمارها، به حجم مساوی آب مقطر استریل اضافه شد. گلدانها در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آبیاری دوبار در هفته در حد ظرفیت زراعی انجام می‌شد که یک‌بار آن توسط مکمل غذایی لانگ اشتون (Hewitt,1952) انجام می‌گرفت.

گیاهان در تیمارهای مختلف ۴۵ روز بعد از کاشت، برداشت شدند و شاخص‌هایی ذیل در آنها اندازه‌گیری شد.

وزن تر و خشک اندامهای هوایی: جهت اندازه‌گیری وزن خشک، اندامهای هوایی گیاهان به مدت ۴۸ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

وزن تر و خشک ریشه : وزن تر ریشه ها پس از شستشوی کامل خاک گلدانی و خشک شدن سطح ریشه ها اندازه گیری شد و در مورد وزن خشک نیز مانند اندامهای هوایی عمل شد.

تعداد متوسط گالها در هر گرم وزن ریشه و کل ریشه

به این منظور در تیمارهای حاوی نماتد از ریشهٔ هر تکرار ۳ نمونهٔ یک گرمی تهیه شد و پس از شمارش تعداد گالها توسط استرئومیکروسکوپ، میانگین آن محاسبه گردید و از حاصلضرب متوسط گالها در هر گرم ریشه در وزن کل ریشه تعداد گال در کل سیستم ریشه محاسبه گردید.

تعداد متوسط کیسه های تخم در هر گرم وزن ریشه و در کل ریشه

به این منظور در تیمارهای حاوی نماتد از ریشهٔ هر تکرار ۳ نمونهٔ یک گرمی تهیه شد و پس از شمارش تعداد کیسه های تخم توسط استرئومیکروسکوپ، میانگین آن محاسبه گردید و از حاصلضرب متوسط کیسه های تخم در هر گرم ریشه در وزن کل ریشه تعداد آن در کل سیستم ریشه محاسبه گردید.

فراوانی مایکوریزایی (F%) و تراکم مایکوریزایی (درصد کلنیزاسیون مایکوریزایی)(M%)

جهت اندازه گیری دو شاخص فوق در این تحقیق ابتدا از روش فیلیپس و هایمن (۱۹۷۰) برای رنگ آمیزی ریشه ها استفاده گردید. بدین منظورمراحل ذیل انجام شد :

در ابتدا ریشه ها به خوبی و توسط آب شستشو داده شده و به قطعات ۱-۲ سانتیمتری بریده شدند. جهت شفاف سازی ، ریشه ها به مدت ۴۵ دقیقه در محلول پتاس ۱۰ درصد (KOH) در حمام بن ماری در حال جوش قرار گرفتند. زمان و دمای شفاف سازی بستگی به نوع بافت ریشه دارد. برای ریشه های ظریف و دارای رنگدانه های کم نیاز به زمان و دمای کمتری می باشد. سپس ریشه ها ۳ بار با آب مقطر شسته شدند تا پتاس به خوبی از ریشه ها خارج گردد. در این مرحله اگر ریشه ها ظریف و فاقد رنگدانه باشند، نیاز به عمل رنگبری با محلول پراکسید هیدروژن قلیایی نیست و در غیر اینصورت بایستی این مراحل نیز انجام گیرد. در این مطالعه به دلیل ظریف بودن ریشه‌های مورد بررسی این مراحل انجام نشد.

در مرحله بعد بایستی ریشه ها اسیدی شوند. برای این کار ریشه ها به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در محلول اسید کلریدریک (HCl) یک درصد قرار گرفتند اما پس از آن با آب شستشو داده نشدند زیرا اسید برای رنگ آمیزی در بافت ریشه مورد نیاز می باشد.

به منظور رنگ آمیزی، ریشه ها در محلول ۰/۰۵ درصد آنیلین بلو (Aniline Blue) در لاکتوفنل قرار گرفته سپس به مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری در حال جوشیدن قرار گرفتند. برای رنگبری ریشه ها، در محلول لاکتوفنل و یا اسید لاکتیک چندین بار شستشو داده شدند . پس از حذف رنگ، اندام های قارچی را می توان به رنگ آبی و از طیف پر رنگ تا کمرنگ بر اساس میزان تراکم ساختار قارچی و رنگ پذیری آن ها مشاهده نمود. پس از رنگ آمیزی ریشه ها با استفاده از روش تروولت[1] دو شاخص F% و M% اندازه گیری شدند. به این منظور ابتدا ریشه ها به قطعات مساوی بطول تقریبی ۰/۵ سانتیمتر تقسیم شدند و ۲۰ عدد از این قطعات با آرایشی منظم در روی یک لام حاوی چند قطره اسید لاکتیک قرار گرفته و توسط لامل پوشیده شدند و با کمی فشار بطور کامل تثبیت گردیدند. بدین ترتیب برای هرتکرار ۳ عدد لام با روش فوق تهیه و جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری نگاهداری شدند.

سپس از رابطه $F\% = 100(N-n_0)/N$ فراوانی مایکوریزایی برای هر اسلاید بدست آمد و از میانگین ۳ اسلاید این شاخص برای هر تکرار محاسبه گردید در این رابطه F = فراوانی میکوریزایی، n_0= تعداد قطعات بدون آلودگی و N= تعداد کل قطعات مورد بررسی می باشد این شاخص درصد قطعات آلوده را محاسبه می کند.

جهت تعیین شاخص درصد کلنیزاسیون مایکوریزایی ابتدا باید گروه یا کلاس مایکوریزایی هر قطعه در اسلاید ها مشخص شود، در این بررسی ها تنها مشاهده و وجود ساختارهای قارچی بدون توجه به نوع آن اعم از میسلیوم، آربوسکول و وزیکول قارچ مد نظر است. بر

1- Trouvelot,1986

این اساس گروه یا کلاس میکوریزایی به این صورت تعیین می شود که قطعات بدون هیچگونه آلودگی در کلاس صفر ، قطعات با آلودگی کمتر از۱ درصد در کلاس ۱ ، قطعاتی که بین ۱ تا ۱۰ درصد حجم کل آن ها توسط ساختار قارچی کلنیزه شود در کلاس ۲ ، قطعاتی با آلودگی بین ۱۱ تا ۵۰ درصد در کلاس ۳ ، قطعات با آلودگی بین ۵۱ تا ۹۰ درصد در کلاس ۴ و قطعات با آلودگی بین ۹۱ تا ۱۰۰ درصد در کلاس ۵ قرار گرفتند سپس تراکم یا درصد کلنیزاسیون مایکوریزایی از رابطه ذیل بدست آمد:

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

در این رابطه M تراکم میکوریزایی n_1 و n_2، n_3، n_4، n_5 به ترتیب تعداد قطعات موجود در کلاسهای ۵ تا ۱ و N= تعداد کل قطعات مورد بررسی میباشند. این شاخص درصد متوسط کلنیزاسیون قطعات ریشه را محاسبه می کند.

جهت آنالیز آماری در تمامی قسمتها از نرم افزار آماری MSTAT-C استفاده شد و مقایسه میانگین ها توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج و بحث

در تیمارهای مختلف، اثرات ناشی از برهم کنش قارچ ونماتد، برشاخص های رشدی گیاه ، شاخص های بیماری نماتدی و شاخص‌های توسعه مایکوریزی ارزیابی شدند.

در جدول۱ مشاهده می‌کنیم که وزن تر اندامهای هوایی در تیمارهای مایکوریزی *G. mosseae* و *G. intraradices* نسبت به تیمارهای حاوی نماتد و همچنین نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد بنابراین نتیجه می‌گیریم که قارچهای مایکوریزی در این آزمایش منجر به افزایش فتوسنتز و تولید گیاهی شده‌اند، تیمارهای قارچی و تیمارهای تلفیقی قارچ و نماتد نیز در این جدول با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند به‌گونه‌ای که تیمار قارچی *G. mosseae* نسبت به *G. intraradices* و تیمار برهم کنش *G. mosseae* و نماتد نسبت به تیمار برهم کنش *G. intraradices* و نماتد، افزایش معنی‌داری در وزن تر اندامهای هوایی نشان می‌دهند بنابراین نتیجه می‌گیریم قارچ مایکوریزی *G. mosseae* نسبت به *G. intraradices* در بهبود رشد و عملکرد گیاه نقش فعال‌تری به عهده دارد که که عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمار برهم کنش *G. intraradices* و نماتد با شاهد این موضوع را تأیید می‌کند.

همچنین این افزایش معنی‌دار در تیمارهای مربوط به *G. mosseae* می‌تواند ناشی از کنترل بهتر بیماری نماتدی توسط این گونه قارچی باشد. در تیمار نماتدی *M. javanica* نیز کاهش معنی-داری در وزن تر اندامهای هوایی مشاهده می‌شود که دلیل آن ایجاد تنش آبی ناشی از بیماری و کاهش فتوسنتز و درنتیجه عملکرد گیاه می‌باشد.

جدول ۱- وزن تر و خشک ریشه و اندامهای هوایی در تیمارهای مختلف ٤٥ روز بعد از کاشت

تیمار	وزن تر اندامهای هوایی(گرم)	وزن تر ریشه	وزن خشک اندامهای هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه
G.mosseae	۱۹۰/۴±۳/۹۱A	۴۸/۶±۲/۴۲ B	۲۷/۹±۰/۸۰ A	۸/۸±۰/۶۰ B
Gm+Mj	۱۷۵/۲± ۳/۴۵ B	۴۷/۱±۲/۹۵ BC	۲۶/۵±۰/۸۰ A	۸/۶±۰/۵۰ B
G.intraradices	۱۵۶/۲± ۴/۸۸ C	۴۳/۶±۲/۶۶ C	۲۲/۶±۰/۸۵ B	۸±۰/۶۷ B
Gi+ Mj	۱۴۶/۲± ۲/۷۲D	۵۵/۶±۲/۰۷ A	۲۰/۹±۰/۵۷ C	۱۰/۷±۰/۳۲ A
M. javanica	۱۱۲/۵± ۶/۰۱ E	۵۸/۴±۲/۷۵ A	۱۵/۷± ۱/۱۰ D	۱۱/۴۰±۰/۶۲A
شاهد	۱۴۶/۵± ۶/۷۰ D	۴۳±۱/۳۰ C	۲۰/۷±۱/۰۷ C	۸±۰/۴۶ B

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

جدول۲- تعداد گال وکیسه تخم در هر گرم وزن تر ریشه و کل ریشه ٤٥ روز بعد از کاشت

تیمار	تعداد گال/ گرم	تعداد گال در کل ریشه	تعداد کیسه تخم/ گرم	تعداد کیسه تخم در کل ریشه
G.mosseae +M.javanica	۳/۹±۰/۲۳ C	۱۸۷/۴±۲/۱۰ B	۱/۶±۰/۱۷ B	۷۷/۱±۱/۸۰ B
G.intraradices +M.javanica	۱۳/۳±۰/۲۰B	۷۴۰/۳±۱/۸۹ A	۱/۹±۰/۳۰ B	۱۰۶/۸±۲/۹۱ B
M.javanica	۱۶/۶±۰/۲۱ A	۹۷۴±۳/۷۸ A	۸/۶±۰/۲۵ A	۵۰۵/۲±۲/۵۳ A

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند. جهت نرمال کردن واریانس‌ها از جذر داده‌ها جهت آنالیز واریانس و مقایسه میانگین استفاده شد.

جدول۳- فراوانی مایکوریزایی (F%) و تراکم مایکوریزایی (M%) ٤٥ روز پس از کاشت در تیمارهای مختلف

تیمار	فراوانی مایکوریزی (F%)	تراکم مایکوریزایی (M%)
G.Mosseae	۹۵±۲/۴ A	۸۷/۳± ۴/۹۱ A
G.mosseae + M.javanica	۹۱±۱/۶ A	۸۸/۵±۶/۰۵ A
G.intraradices	۹۴± ۲/۲ A	۲۲/۹±۰/۸۵ B
G.intraradices +M. javanica	۸۹±۳/۱ A	۲۲/۳±۱/۴۴ B

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند. جهت نرمال کردن واریانس ها دادهها با استفاده از Arcsine به زاویه تبدیل شدند.

کوتاری وهمکاران (۱۷) نشان دادند که قارچهای مایکوریز آربوسکولار در شرایط تنش آبی باعث افزایش تحمل و بهبود رشد گیاه می‌شوند. درمورد وزن خشک اندامهای هوایی نیز نتایج مانند وزن تر است با این تفاوت که تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار *G. mosseae* و تیمار برهم کنش *G. mosseae* و نماتد مشاهده نمی‌شود.

در جدول۲ به دلیل اینکه دادههای این جدول از طریق شمارش به دست آمدند جهت نرمال کردن واریانس‌ها از جذر دادهها جهت آنالیز واریانس و مقایسه میانگین استفاده شده است و تنها در مورد شاخص تعداد کیسه تخم در هر گرم وزن تر ریشه به دلیل کوچک بودن دادهها قبل از جذرگیری مقدار ثابت ۰/۵ به دادهها اضافه شده است بدیهی است پس از مقایسه میانگین‌ها دادههای تبدیل شده به توان دو رسیده و در جدول قرار گرفته‌اند.

در جدول۲ مشاهده می‌کنیم که درمورد شاخص تعداد گال در هر گرم وزن تر ریشه بین تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد و کاهش تعداد گال بر گرم در تیمار حاوی *G. mosseae* نسبت به تیمار حاوی *G. intraradices* در مقایسه با تیمار نماتدی نشان-دهنده تأثیرگذاری مؤثرتر گونه *G. mosseae* در کنترل بیماری نماتدی است، عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمار برهم کنش *G. intraradices* و نماتد با تیمار نماتدی در شاخص تعداد گال در کل ریشه نیز این موضوع را تأیید می‌نماید. الشیخ و میرقانی (۷) نشان دادند که گونه‌ای از جنس *Glomus* sp. قادر به کاهش تعداد گال در بیماری نماتدی ایجاد شده توسط *M. incognita* در گوجه-فرنگی می‌باشد. درمورد شاخص‌های تعداد کیسه تخم در هر گرم وزن تر ریشه و در کل ریشه تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی مایکوریز وجود ندارد اما این تیمارها با تیمار نماتدی *M. javanica* اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهند که نشان‌دهنده‌ی نقش قارچهای مایکوریزی در جلوگیری از تولیدمثل نماتد است. البته قابل ذکر است تعداد کیسه تخم در تیمار مربوط به *G. mosseae* کاهش محسوسی نسبت به *G. intraradices* نشان می‌دهد که مؤید نقش بارزتر آن در کنترل تولید مثل نماتد است.

کارلینگ و همکاران (۳) در آزمایشی نشان دادند که تعداد تخم تولید شده توسط نماتد ریشه گرهی *M. incognita* در هر گرم از وزن ریشه و در کل ریشه در تیمارهای مایکوریزی نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.

در جدول ۳ درمورد شاخص فراوانی مایکوریزی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد نماتد گرهی ریشه تأثیر منفی بر روی این شاخص نمی‌گذارد و مانع از توسعه مایکوریزی نمی‌گردد. درمورد شاخص تراکم مایکوریزایی مشاهده می‌کنیم که بین دو تیمار *G. mosseae* و *G. intraradices* تفاوت معنی‌داری وجود دارد و گونه *G. mosseae* دارای توانایی کلنیزاسیون بالاتری در رقم گوجه‌فرنگی موردآزمایش می‌باشد و می-توانیم نتیجه‌گیری کنیم که توانایی پایین گونه *G. intraradices* در کنترل سایر شاخص‌های نماتدی نیز ناشی از پایین بودن درصد کلونیزاسیون است. زیرا افزایش کلونیزاسیون منجر به افزایش اندامهای قارچی نظیر آربوسکول‌ها می‌شود امروزه مشخص شده که بسیاری از الیسیتورهای مایکوریزی که منجر به تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌شوند در سطح آربوسکول‌ها تولید می‌گردند (۱۱).

تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط قارچهای مایکوریزی آربوسکولار می‌تواند منجر به تولید ترکیبات آنزیمی مانند کیتینازها شود که در کنترل بیماریهای گیاهی از جمله بیماریهای قارچی و خصوصاً نماتدی نقش مهمی ایفا می‌کنند. پوزو و همکاران (۲۶) در آزمایشی نشان دادند که دوگونه قارچی *G. mosseae* و *G. intraradices* منجر به تولید دوایزوفرم از کیتیناز در گیاه گوجه-فرنگی می‌شوند و بیماری قارچی ناشی از *Phytophthora parasitica* را کنترل می کنند.

لی و همکاران (۱۸) نشان دادند که گونه مایکوریزی *Glomus versiforme* منجر به افزایش بیان ژن‌کیتیناز VCH3 در تیمار برهم کنش مایکوریز و نماتد ریشه گرهی *M. incognita* و کاهش درصد آلودگی نماتدی می‌شود. در مجموع نتایج این آزمایش نشان دهنده اینست که می توانیم از قارچهای مایکوریزی آربوسکولار به عنوان یک عامل کنترل زیستی در مهار بیماری نماتدی گره ریشه و نیز جهت افزایش عملکرد گیاه گوجه فرنگی استفاده کنیم که این امر می تواند نگرانی های زیست محیطی موجود در زمینه مصرف سموم

نماتد کش و کودهای شیمیایی را برطرف سازد و پیشنهاد می‌شود در زمینه مکانیزمهای موثر در القای مقاومت نسبت به عوامل بیماریزا توسط این قارچها و مکانیزمهای دخیل در بهبود رشد گیاهان تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

منابع

1- Azco´ n-Aguilar C., Barea J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza, 6:457-464.

2- Bagyaraj D.J. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi and their role in Horticulture. In: Recent trends in horticultural biotechnology. Keshavchandran et al. (Eds.), pp:53-58.

3- Carling D.E., Roncadori R.W. and Hussey R.S. 1989. Interaction of Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal Fungi ,Root-Knot Nematode , and phosphorus fertilization on soybean.Plant disease 73:730-733

4- Deberdta P., Queneherveb P. 1999. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the Mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathology 48 :408-414.

5- De la Pen˜ a E., Rodriguez-Echeverria S., Putten W.H., Freitas H., and Moens M. 2006.Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. New Phytologists, 169:829-840.

6- Diedhiou P.M., Hallmann J., Oerke E.C., and Dehne H.W. 2003.Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and a non- pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato .Mycorrhiza,13:199-204

7-Elsen A., Baimey H., Swennen R., and De Waele D.,2003.Rlative mycorrhizal dependency and mycorrhiza nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.)differing in nematode susceptibility .plant soil ,256:303-313.

8- Elsheikh E.A.E., and Mirghani M.O. 1997. Interaction of VA mycorrhiza and root knot nematode inoculum density ,soil texture and soil sterilization .Jonares,vol.1,No.1: 1-6

9- Fritz M., Jakobsen I., Lyngkjaer M.F., Thordal-Christensen H., and Pons-Kuehnemann J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza, 16:413-419.

10. Gernns H., Von Alten H., and Poehling H.M. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen -is a compensation possible? Mycorrhiza, 11:237-243.

11- Harrison M.J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review Microbiology, 59:19-42.

12- Hewitt E.J. 1952. In Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication 22. Farnham Royal ommonwealth Agricultural Bureau, Bucks, United Kingdom.

13-Hussey R.S., and Janssen G.J.W. 2002.Root –knot nematodes : *Meloidogyne* species In "Plant resistance to parasitic nematodes " (Starr,J.L., Cook,R., Bridge,J.,eds.) CAB International , Wallingford, Oxon,UK.pp.43-70

14- Hussey R.S. 1985. Host-parasite relationships and associated physiological changes. p.143-153 In Sasser, J.N. and C.C. Carter (eds.) An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. I Biology and Control. N. C. State University, Raleigh, North Carolina.

15- Kerry B.R. 2000**.** Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. Phytopathology 38: 423-441

16- Kok C.J., and Papert A. 2002. Effect of temperature on invitro interactions between *Verticillium chlamydosporiium* and other *Meloidogyne* associated microorganisms .Biocontrol , 47:603-609.

17- Kothari S.K., Marschner H., and George E. 1990.Effect of VA mycorrhizal fungi and microorganisms on root and shoot morphology ,growth and water relations in maize .New phytologists ,116:303-311.

18- Li H.Y., Yang G.D., Shu H.R., Yang Y.T., Ye B.X., Nishida I., and Zheng C.C. 2006.Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene *VCH3*. Plant Cell Physiology, 47:154-163.

19- Lingua G., D'Agostino G., Massa N., Antosiano M., and Berta G. 2002. Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. Mycorrhiza, 12:191-198.

20-Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C.D., and Harrison M.J. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. Plant Journal, 50:529-544.

21- Melakeberhan H. and Webster L.M. 1993 . The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. Pp. 26-41. In: Nematode Interactions. Khan M.W.
22-Melakeberhan H., Ferris H. and Dias J. 1990. Physiological responses of resistant and susceptible *Vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 22: 224-230.
23- Oka Y., Koltai H., Bar-Eyal M., Mor M., Sharon E., Chet I., and Spiegel Y. 2000.New strategies for the control of plant parasitic nematodes .Pest management science ,56:983-988.
24-Parniske M. 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Current Opinion Plant Biology, 7:414-421
25-Powell N.T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annu. R611. Phytopatology/201., 9: 253- 274.
26-Pozo M.J., and Azcon-Aguilar C. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or *Phytophthora parasitica* .Journal of experimental botany.49:327, 1729-1739
27- Reinhardt D. 2007. Programming good relations -development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Current Opinion Plant Biology, 10:98-105.
28- Sasser J.N. and Carter C.C. 1985. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. I: Biology and Control. North Carolina State University Graphics. 422 p.
29- Scarbilovich T.S. 1959. On the structure of systematics of nematodes order Tylenchida Thome, 1949. Acta Parasite Polonica.7 : 117-132.
30-Schübler A., Schwarzott D. and Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research 102: 1413-1421.
31- Shaul O., Galili S., Volpin H., Ginzberg I., Elad Y., Chet I., and Kapulnik Y. 1999.Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. Mol Plant Microbe Interact, 12:1000-1007.
32- Siddique I.A., Ehteshamul-Haque S., and Shaukat S.S. 2001. Use of rhizobacteria in the control of rot-root knot root disease complex of mungbean .Journal of phytopathology ,149:337-349.
33-Singh B., and Dhawn S.C. 1994. Effect of *pasteuria penetrans* on the penetration and multiplication of *Heterodera cajani* in vigna unguiculata roots .Nematologica meditrania ,22:159-161
34-Spiegel Y., Cohn E., Galper S., Sharon E., and Chet I. 1991. Evaluation of a newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp. nov. for controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Biocontrol Science and Technology. 1:115-125.
35- Starr J.L., Bridge J., and Cook R. 2002.Resistance to plant parasitic nematodes:History ,current use future potentials . In " Plant resistance to parasitic nematodes" (Starr,cook,R.,Bridge,J.,eds.) CAB International Wallingford ,Oxon , UK.pp.1-22.
36- Trudgill D.L. and Block V.C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annual Review of phytopathology ,39:53-77.
37- Trudgill D.L., Kerry B.R., and Phillips M.S. 1992. Seminar: Integrated Control of Nematodes (With Particular Reference To Cyst and Root Knot Nematodes). Nematologica, 38: 482-487.
38-Van Gundy S.D., Kirkpatrick J.D. and Golden J. 1977**.** Nature and role of metabolic leakage from root-knot nematode galls and infection by *Rhizoctonia solani* .Journal of Nematology ,9:113-121.
39- Whipps J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany, 82:1198-1227.