نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۲، شماره ۲، پائیز و زمستان۱۳۹۲ (۱۳۷-۱۲۹)

تأثیر دو قارچ میکوریز *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* بر بیماری پوسیدگی ریشهٔ نخودفرنگی با عامل *Fusarium solani* f. sp. *pisi* در شرایط گلخانه‌ای

۱. محبوبه سهرابی؛ ۲. حمید محمدی*؛ ۳. امیرحسین محمدی
۱. ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور
(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۱۶)

چکیده

در این مطالعه تأثیر دو قارچ *Glomus mosseae* و *G. intraradices* به تنهایی و ترکیب آن‌ها بر فاکتورهای رشد، میزان کلروفیل و بیماری پوسیدگی ریشهٔ نخودفرنگی با عامل *Fusarium solani* f.sp. *pisi* در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ای کاملاً تصادفی با هشت تیمار و چهار تکرار انجام شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده همهٔ تیمارهای مربوط به قارچ‌های میکوریز باعث افزایش فاکتورهای رشد و کلروفیل نسبت به گیاهان شاهد شدند. از بین تیمارهای مورد استفاده، *G. mosseae* نسبت به تیمار *G. intraradices* و تیمار ترکیبی دو قارچ میکوریز بسیار مؤثرتر بود. مایه‌زنی گیاهان با عامل بیمارگر در غیاب قارچ‌های میکوریز، باعث کاهش معنی‌دار فاکتورهای رشد و غلظت کلروفیل (در سطح ۱ درصد) نسبت به گیاهان شاهد شد. در حضور قارچ‌های میکوریز کلنیزاسیون ریشه توسط عامل بیمارگر کاهش یافت و تیمار *G. mosseae* نسبت به تیمارهای دیگر تأثیر بیشتری داشت. در گیاهان میکوریزی که با عامل بیمارگر مایه‌زنی شده بودند، افزایش معنی‌داری در فاکتورهای رشد و غلظت کلروفیل در مقایسه با شاهد آلوده مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده تیمار *G. mosseae* بهترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری و افزایش فاکتورهای رشد نخودفرنگی دارد.

کلیدواژگان: فاکتورهای رشد، کلروفیل، Arbuscular mycorrhiza، *Pisum sativum*.

مقدمه

نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) گیاهی یک‌ساله از تیرهٔ بقولات (Fabaceae) است. براساس آمار ارائه‌شده توسط FAO بیماری‌های قارچی بیشترین سهم را در ایجاد خسارت و در نتیجه کاهش میزان محصول در نخودفرنگی دارند (Nene *et al.*, 1991). از میان یکصد و پانزده بیماری گزارش‌شده روی نخودفرنگی، پوسیدگی فوزاریومی ریشه اهمیت بیشتری دارد (Nene *et al.*, 1991). بیماری پوسیدگی سیاه ریشهٔ نخودفرنگی اولین‌بار، در سال ۱۹۶۹، از ایالت واشنگتن و سپس، از کالیفرنیا و هندوستان گزارش شد. براساس مطالعات انجام‌شده فرم اختصاصی *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f.sp. *pisi* H. N. Hans به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه در نخودفرنگی تعیین شده است (Westerlund *et al.*, 1974). مبارزه با قارچ فوزاریوم مانند بیشتر قارچ‌های خاکزاد کار چندان ساده‌ای نیست. روش‌های مختلفی از جمله فیزیکی، شیمیایی، زراعی، بیولوژیکی و تلفیقی می‌تواند برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده شوند (Naseby *et al.*, 2000). تاکنون، تحقیقات زیادی دربارهٔ کنترل بیولوژیکی عوامل بیمارگر گیاهی انجام شده است و میکروارگانیسم‌های زیادی تحت شرایط باغی و مزرعه‌ای بررسی شده‌اند (Whipps 2004). از جمله نمونه‌های موفق در این زمینه استفاده از گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز داخلی از جمله

تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۶۸۲
Email: hmohammadi@uk.ac.ir

گونه‌های *Glomus* هستند (Caron *et al.*, 1986; Hwang *et al*., 1992).

یکی از تأثیرات مهم قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، افزایش رشد و میزان محصول در گیاهان است که معمولاً این کار از طریق بهبود جذب عناصر غذایی کم‌تحرک در محلول خاک نظیر فسفر، روی و مس (Al-Karaki and Hammad 2001) یا تسریع در جذب و انتقال آب و مواد غذایی به گیاهان است (Sheng *et al*, 2008, Smith and Read 2008). ارتباط دو طرفهٔ قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و گیاهان می‌تواند باعث افزایش سلامت گیاهان و غلبه بر تنش‌های زنده و غیرزنده شود (Barea and Jeffries 1995). توجه به این نکته نیز ضروری است که کارایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به‌عنوان یک عامل کنترل‌کنندهٔ بیماری‌های گیاهی به فاکتورهای زنده و غیرزندهٔ متعددی مانند دما، رطوبت، خاک، میزان فسفر خاک، ژنوتیپ میزبان و قارچ، زمان مایه‌زنی، میزان مایهٔ بیماری و قدرت تهاجم آن و میکروفلور خاک بستگی دارد (Singh *et al.*, 2000). کاهش بیماری در گیاهان میزبان کلنیزه‌شده توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار نتیجهٔ عکس‌العمل‌های متقابل و پیچیده‌ای است که بین گیاه میزبان و قارچ‌های میکوریز داخلی وجود دارد (Harrier and Watson 2004). مطالعات نشان داده است که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به‌طور مستقیم نسبت به عوامل بیمارگر عکس‌العمل نشان نمی‌دهند، بنابراین، فرآیندهای حفاظت احتمالاً از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم انجام می‌شود (Harrier and Watson 2004). جنس *Glomus* بزرگ‌ترین جنس در قارچ‌های میکوریز آربوسکولار است و تاکنون، حدود نود گونه برای آن توصیف شده است (Schwarzott *et al.*, 2001). استفاده از *G. intraradices* علیه پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی نشان داده است که وجود این قارچ میکوریزی باعث کاهش تعداد زادمایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* و بافت‌مردگی ریشه می‌شود (Caron *et al.*, 1986). نتایج مشابهی در خصوص گیاه یونجهٔ مایه‌زنی‌شده با سه گونه از *Glomus* نیز به‌دست آمده است که نشان می‌دهد علاوه بر افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه یونجه، میزان زادمایه و بیماری ایجادشده توسط دو گونهٔ *Verticillium albo-atrum* و *F. oxysporum* f.sp. *medicagenis* در این گیاه نیز کاهش می‌یابد (Hwang *et al.*, 1992). مطالعه‌ای که فیلیون و همکاران (Fillion *et al.*, 2003) در مورد لوبیا انجام دادند، بیانگر آن است که مایه‌زنی *G. intraradices* باعث کاهش علائم پوسیدگی ریشهٔ لوبیا بر اثر *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* و همچنین، کاهش معنی‌دار مقدار DNA ژنومی بیمارگر در ریشه و حتی در خاک میکوریزوسفر می‌شود (Fillion *et al.*, 2003). تاکنون، مطالعهٔ چندانی دربارهٔ تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر پوسیدگی سیاه ریشهٔ نخودفرنگی انجام نشده است؛ بنابراین، هدف از این تحقیق ارزیابی تأثیر دو گونهٔ *G. mosseae* و *G. intraradices* در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه، میزان کلروفیل و فاکتورهای رشدی نخودفرنگی در شرایط گلخانه است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مایهٔ تلقیح قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

در این تحقیق از دو گونهٔ *Glomus* شامل *G. mosseae* Gerdemann & Trapp (Nicol & Gerd) و *G. intraradices* Shenck & Smith استفاده شد. جدایه‌های خالص هر دو گونه از مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور تهیه و برای تکثیر این جدایه‌ها از گیاه یونجه استفاده شد. ابتدا، بذور یونجه با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و پس از سه‌بار شست‌وشو با آب مقطر سترون (هربار به مدت ۱۰ دقیقه) داخل ظروف یک‌بار مصرف پلاستیکی ضدعفونی‌شده با الکل اتیلیک و در میان دو لایهٔ دستمال کاغذی اتوکلاوشده برای جوانه‌زنی قرار داده شدند. سپس، ۸ـ۷ بذر یونجه در گلدان‌های پلاستیکی ۸۰۰ گرمی کاشته شدند. ابتدا، در ته گلدان‌ها یک لایهٔ ۳ سانتی‌متری از ماسهٔ شستهٔ سترون ریخته شد و سپس، روی آن یک لایهٔ ۲ سانتی‌متری از مایهٔ قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و یک لایهٔ ۳ تا ۴ سانتی‌متری نیز از ماسهٔ سترون ریخته شد. بذور یونجه در لایهٔ رویی کاشته شدند و روی آن‌ها با ماسهٔ سترون پوشانده شد. آبیاری گلدان‌ها در حد ظرفیت مزرعه و با روش وزنی انجام شد. در طول دورهٔ رشدی ۴۰ تا ۶۰ روزه از محلول

غذایی هوگلند نصف غلظت (بدون منبع فسفر) برای تأمین نیازهای غذایی گیاهان استفاده شد (Hoagland and Arnon 1950). بعد از این مدت، برای اطمینان از کلنیزه‌شدن ریشه‌ها با قارچ‌های میکوریز چند گلدان انتخاب و ریشهٔ گیاهان پس از رنگ‌آمیزی بررسی شد. پس از اطمینان از کلنیزه‌شدن ریشه‌ها، آبیاری گلدان‌ها قطع شد و پس از دو هفته، اندام‌های هوایی به‌طور کامل جدا شدند. محتوای خاک گلدان‌ها به‌طور کامل مخلوط و برای خشک‌شدن به مدت ۱۰ روز در دمای اتاق نگه‌داری شدند. برای تهیهٔ مایهٔ قارچ‌های میکوریزی، ریشه‌های یونجه کاملاً خرد و به‌طور یکنواخت با خاک گلدان‌ها مخلوط شدند.

تهیهٔ مایهٔ *Fusarium solani* f.sp. pisi

برای تهیهٔ سوسپانسیون اسپور قارچ *F. solani* f.sp. *pisi* ابتدا چندین بلوک میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ پرگنه هفت روزهٔ قارچ انتخاب و به چندین تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA (۳۹ گرم در لیتر، مرک، آلمان) منتقل شدند به‌گونه‌ای که در مرکز هر تشتک پتری یک بلوک میسلیومی قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ـ۷ روز نگه‌داری شدند و پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر تشتک پتری، سطح پرگنه‌ها با یک میلهٔ L شکل سترون کاملاً خراش داده شد تا سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ به‌دست آید. سوسپانسیون حاصل از پارچهٔ ململ عبور داده شد و با هماسیتومتر سوسپانسیون اسپوری به غلظت 1×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد.

بررسی تأثیر مایه‌زنی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر بیماری پوسیدگی فوزاریومی نخودفرنگی

به‌منظور بررسی تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر بیماری پوسیدگی فوزاریومی، آزمایشی با هشت تیمار به‌صورت فاکتوریل در قالب یک طرح پایه‌ای کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارهای مورد استفاده به شرح زیر بودند:

تیمار ۱: شاهد (بدون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و فوزاریوم)، تیمار ۲: مایه‌زنی با *F. solani* f.sp. *pisi* (Fus)، تیمار ۳: مایه‌زنی با *G. mosseae* (Gm)، تیمار ۴: مایه‌زنی با *G. intraradices* (Gi)، تیمار ۵: مایه‌زنی با ترکیب Gm+Gi، تیمار ۶: برهم‌کنش Gm با Fus (Gm+Fus)، تیمار ۷: برهم‌کنش Gi با Fus (Gi+Fus)، تیمار ۸: برهم‌کنش ترکیب Gm+Gi با Fus (Gm+Gi+Fus)

کاشت بذور نخودفرنگی و مایه‌زنی با قارچ‌های میکوریز و عامل بیمارگر

بذور نخودفرنگی به مدت ۱۵ـ۱۲ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی و سه مرتبه (هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه) با آب مقطر سترون شسته شدند. بذور به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده و برای جوانه‌زنی بین دو لایهٔ دستمال کاغذی اتوکلاوشده قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، بذور جوانه‌زده در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلوگرمی کاشته شدند. ابتدا، در کف هر گلدان صد گرم از مایهٔ قارچ‌های میکوریز (با حدود ۱۰۰۰ پروپاگول در هر گرم) ریخته شد و روی آن یک لایهٔ ۱۰ سانتی‌متری از مخلوط خاک بکر پاستوریزه‌شده و ماسهٔ شستهٔ سترون (به نسبت ۱:۲) ریخته شد. سپس هشت بذر جوانه‌زدهٔ نخودفرنگی در هر گلدان قرار داده شد و روی آن‌ها با ۲ سانتی‌متر ماسهٔ شستهٔ سترون پوشانده شد. بعد از اطمینان از رشد گیاهچه‌ها، در هر گلدان پنج گیاهچهٔ نسبتا یکسان انتخاب و بقیه حذف شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه به مدت چهار هفته نگه‌داری و رطوبت آن‌ها در حد ظرفیت زراعی و با وزن‌کردن گلدان‌ها تأمین شد. مایه‌زنی گیاهان نخودفرنگی با فوزاریوم، چهار هفته پس از کاشت بذور نخودفرنگی و اطمینان از کلنیزه‌شدن ریشه‌ها با قارچ‌های میکوریز انجام شد. یک روز قبل از مایه‌زنی، گلدان‌ها آبیاری شدند تا عمل مایه‌زنی راحت‌تر انجام شود. برای مایه‌زنی مقداری از خاک اطراف هر بوته کنار زده شد و در کنار طوقهٔ هر گیاه به میزان ۸ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر ریخته شد. (در گیاهان شاهد ۸ میلی‌لیتر آب مقطر استریل استفاده شد.) گلدان‌ها تا زمان بروز علائم بیماری در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند.

برداشت گیاهان و ارزیابی شاخص‌های مورد نظر

شش هفته بعد از مایه‌زنی فوزاریوم، برداشت گیاهان انجام شد. ابتدا، بخش‌های هوایی گیاهان در محل طوقه از ریشه‌ها جدا و یک گرم از برگ و ریشه‌ها به‌طور تصادفی برداشت شدند. برگ‌ها برای تعیین میزان کلروفیل در فریزر و ریشه‌ها به منظور رنگ‌آمیزی و تعیین درصد کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در محلول FAA (Formalin Acetic Aci d Alcohol) نگه‌داری شدند. ارتفاع ساقهٔ گیاهان از محل طوقه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند. باقیماندهٔ اندام هوایی و ریشه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. پس از این مدت، وزن خشک آن‌ها تعیین شد. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل برگ‌ها از روش کیرک (Kirk 1968) و بهبودیان و همکاران (Behboudian *et al.*, 1986) استفاده شد.

برای تعیین میزان کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از روش کورمانیک و مک گراو (Kormanik and Mc Graw 1982) و با کمی تغییر به شرح زیر انجام شد. ابتدا، یک گرم از ریشهٔ گیاهان با آب مقطر کاملاً شسته شد و به مدت یک ساعت در لوله‌های آزمایش حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۲ درصد داخل بن‌ماری با دمای ۹۰ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد تا رنگ‌بری ریشه‌ها انجام شود. پس از این مدت، هیدروکسید پتاسیم حذف شد. پس از شستن نمونه‌ها با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول آب اکسیژنه قلیایی در دمای اتاق نگه‌داری شدند. سپس، نمونه‌ها به‌طور کامل با آب شست و شو داده شدند. در مرحلهٔ بعد نمونه‌های شسته‌شده در محلول اسید کلریدریک ۱ درصد به مدت ۴ـ۳ دقیقه نگه‌داری و بدون شست‌وشو در داخل محلول لاکتوگلیسرول اسید فوشین ۰/۰۱ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. برای ارزیابی میزان کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در ریشهٔ گیاهان، نود قطعهٔ ۱ سانتی‌متری از ریشه‌ها روی اسلاید قرار داده شدند و با استفاده از میکروسکوپ دارای لنز مدرج اندام قارچ‌های میکوریز آربوسکولار داخل ریشه‌ها بررسی و شمارش شد (Vierheiling *et al.*, 2005). نتایج به‌دست‌آمده با نرم‌افزار MSTAT C تجزیه و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

برای ارزیابی میزان کلنیزاسیون ریشهٔ گیاهان توسط عامل بیمارگر *F. solani* f. sp. *pisi*، مقدار مساوی از ریشهٔ گیاهان انتخاب و به مدت ۲۰ دقیقه با آب شرب کاملاً شسته شدند. سپس، ریشه‌ها به قطعات ۵ میلی‌متری تقسیم شدند و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (به مدت ۲ دقیقه) و سه مرتبه شست‌وشو با آب استریل و خشک‌شدن میان دستمال کاغذی روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصارهٔ سیب‌زمینی ـ دکستروز ـ آگار کشت داده و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. برای هر گیاه چهل قطعهٔ ریشه کشت داده شد و درصد کلنیزاسیون با نسبت ظهور پرگنه‌ها از قطعات آلوده به کل قطعات کشت‌شده محاسبه شد. ارزیابی شدت بیماری نیز براساس شاخص ۶ درجه‌ای (۰ تا ۵) ارائه‌شده توسط فیلیون و همکاران، در سال ۲۰۰۳ انجام شد.

نتایج

ارزیابی شاخص وزن خشک اندام هوایی و ریشه

براساس نتایج حاصل از جدول ۱، مایه‌زنی قارچ فوزاریوم باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ نخودفرنگی نسبت به تیمار شاهد شد، ولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

در مقابل مایه‌زنی Gm و Gi موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد که این افزایش نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را در سطح ۱ درصد نشان داد، اما مایه‌زنی ترکیب دو قارچ میکوریز آربوسکولار (Gm+Gi) نتوانست باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ نخودفرنگی شود. در تیمار برهم‌کنش Gm+Fus وزن خشک اندام هوایی و ریشه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای مایه‌زنی با Fus و شاهد بود؛ اما در تیمارهای برهم‌کنش Gi+Fus و (Gm+Gi)+Fus وزن خشک اندام هوایی و ریشه‌ها تفاوت معنی‌داری را با شاهد و تیمار مایه‌زنی با Fus نشان نداد. براساس نتایج حاصل از جدول ۱ مشخص شد که مایه‌زنی Gm می‌تواند به‌طور مؤثرتری باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ نخودفرنگی حتی در حضور قارچ فوزاریوم شود.

جدول ۱. تأثیر مایه‌زنی *Glomus mosseae* (Gm)، *G. intraradices* (Gi)، ترکیب Gm+Gi و برهم‌کنش آن‌ها با *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Fus) بر وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ نخودفرنگی

تیمار	وزن خشک ساقه (گرم در هر گلدان)	وزن خشک ریشه (گرم در هر گلدان)
شاهد	۱/۱۵ cd	۰/۵۵ cd
Fus	۰/۹۵ d	۰/۳۸ d
Gm	۲/۰۹ a	۱/۰۷ a
Gi	۱/۵۶b	۰/۶۷ c
Gm+Gi	۱/۳۰bc	۰/۵۵ cd
Gm+Fus	۱/۹۳ a	۰/۸۵ b
Gi+Fus	۱/۰۵ cd	۰/۳۹ d
(Gm+Gi)+Fus	۰/۹۶ d	۰/۳۸ d

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک، طبق آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

ارزیابی شاخص ارتفاع ساقه و میزان کلروفیل

براساس جدول ۲، مایه‌زنی Fus باعث کاهش معنی‌دار و مایه‌زنی Gm و Gi باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع ساقه و غلظت کلروفیل نسبت به تیمار شاهد شد. تیمار مایه‌زنی ترکیب دو قارچ میکوریز آربوسکولار (Gm+Gi) تنها توانست ارتفاع ساقه را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش دهد.

در تیمارهای برهم‌کنش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و Fus، تنها تیمار Gm+Fus توانست موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع ساقه و غلظت کلروفیل نسبت به تیمار شاهد و مایه‌زنی با Fus شود. ارتفاع ساقه و غلظت کلروفیل در تیمارهای Gi+Fus نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان نداد، اما این افزایش نسبت به تیمار Fus دارای تفاوت معنی‌دار بود.

در تیمار (Gm+Gi)+Fus ارتفاع ساقه تفاوت معنی‌داری را با تیمارهای شاهد و مایه‌زنی با Fus نشان نداد. غلظت کلروفیل نیز در این تیمار با شاهد تفاوتی نداشت، اما اختلاف معنی‌داری با تیمار Fus داشت.

شاخص کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و فوزاریوم در ریشه

براساس نتایج جدول ۳، بیشترین میزان کلنیزاسیون ریشه در تیمار مایه‌زنی با Gm مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با Gi و Gm+Gi داشت. مایه‌زنی Fus باعث کاهش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شد، با وجود این، درصد کلنیزاسیون ریشه در تیمار Gm+Fus نسبت به Gi+Fus و (Gm+Gi)+Fus بالاتر و دارای تفاوت معنی‌داری بود. قارچ فوزاریوم در غیاب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار توانست ۶۳ درصد ریشه‌های میزبان را کلنیزه کند که در حضور این قارچ‌ها، درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

جدول ۲. تأثیر مایه‌زنی *Glomus mosseae* (Gm)، *G. intraradices* (Gi)، ترکیب Gm+Gi و برهم‌کنش آن‌ها با *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Fus) بر ارتفاع ساقه و غلظت کلروفیل در گیاه نخودفرنگی

تیمار	ارتفاع ساقه (سانتی‌متر)	غلظت کلروفیل (میلی‌گرم بر گرم)
شاهد	۲۹/۰۵ de	۲/۴۵ cd
Fus	۲۵/۹۰ e	۱/۹۳ e
Gm	۴۳/۸۵ a	۳/۲۵ a
Gi	۳۷/۷۵ b	۲/۷۵ b
Gm+Gi	۳۳/۳۳ c	۲/۵۵ bc
Gm+Fus	۳۷/۷۵ b	۲/۸۰ b
Gi+Fus	۳۰/۴۰ cd	۲/۳۵ cd
(Gm+Gi)+Fus	۲۶/۷۵ e	۲/۲۵ d

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک، طبق آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

بیشترین و کمترین میزان کاهش درصد کلنیزاسیون فوزاریوم در ریشه‌ها به‌ترتیب در تیمارهای Gm+Fus و (Gm+Gi)+Fus مشاهده شد. بررسی شدت بیماری نیز روندی مشابه درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها با فوزاریوم را

نشان داد. بیشترین و کمترین شدت بیماری به‌ترتیب در تیمارهای Fus (۴/۲۵) و Gm+Fus (۱/۰۰) مشاهده شد. تیمارهای Gi+Fus و (Gm+Gi)+Fus از نظر شاخص شدت بیماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

جدول ۳. تأثیر مایه‌زنی *Glomus mosseae* (Gm)، *G. intraradices* (Gi)، ترکیب Gm+Gi و برهم‌کنش آن‌ها با *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (Fus) بر درصد کلنیزاسیون ریشه با قارچ‌های میکوریز و قارچ فوزاریوم در گیاه نخودفرنگی

تیمار	کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز (درصد)	کلنیزاسیون قارچ فوزاریوم (درصد)	شاخص شدت بیماری (درصد)
شاهد	۰ e	۰ d	۰ d
Fus	۰ e	۶۳/۰a	۴/۲۵ a
Gm	۸۹/۰ a	۰ d	۰ d
Gi	۷۱/۰ b	۰ d	۰ d
Gm+Gi	۵۸/۰ c	۰ d	۰ d
Gm+Fus	۷۸/۰ b	۳۱/۰ c	۱ c
Gi+Fus	۵۵/۰ c	۴۷/۰ b	۲/۲۵ b
(Gm+Gi)+Fus	۳۹/۰ d	۵۰/۰ b	۲/۷۵ b

طبق آزمون دانکن میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. شدت بیماری براساس شاخص فیلیون و همکاران، در سال ۲۰۰۳، محاسبه شده است.

بحث

در این تحقیق برهم‌کنش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و عامل بیمارگر *F. solani* f.sp. *pisi* در گیاه نخودفرنگی در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که کلنیزاسیون ریشه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌تواند تأثیرات منفی پوسیدگی فوزاریومی ریشهٔ نخودفرنگی را روی وزن خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع ساقه کاهش دهد، نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات ال ـ عسکر و رشاد (Al-Askar and Rashad, 2010) روی *F. solani* f.sp. *phaseoli* در لوبیا، عبدل فتاح وشبانا (Abdel-Fattah and Shabana, 2002) روی پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه در باقلا و ال ـ حداد و همکاران (El-Haddad *et al*., 2004) روی پوسیدگی سفید پیاز مطابقت دارد. همچنین، بالاتربودن وزن اندام هوایی و ریشهٔ گوجه‌فرنگی و بادنجان در تیمار برهم‌کنش Gm و *Verticillium dahliae* در مقایسه با تیمار مایه‌زنی با *V. dahliae* گزارش شده است (Karagiannidis *et al*., 2002). مطالعات پوزو و همکاران (Pozo *et al*., 1996, 1999, 2002) و تروتا و همکاران (Trotta, *et al*., 1996) نیز نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشهٔ گوجه‌فرنگی‌های میکوریزی که با *P. parasitica* مایه‌زنی شده بودند، در مقایسه با شاهد و تیمار مایه‌زنی با بیمارگر افزایش می‌یابد که این نتایج نشان داد که حضور Gm اثر محافظتی علیه پوسیدگی فیتوفتورایی ریشهٔ گوجه‌فرنگی دارد؛ این نتیجه با یافته‌های این تحقیق در مورد پوسیدگی فوزاریومی نخودفرنگی مطابقت دارد. همان‌گونه که نتایج مربوط به ارتفاع ساقهٔ گیاهان نخودفرنگی نشان داد در حضور Gm ارتفاع ساقه افزایش می‌یابد. گیری و همکاران (Giri *et al*., 2005) نیز به افزایش معنی‌دار ارتفاع و قطر ساقهٔ نهال‌های سَنا (Casia siamea) در حضور *G. fasciculatum* و *G. macrocarpum* اشاره کرده‌اند. کاراگیاندیس و همکاران (Karagiannidis *et al*., 2002) نیز افزایش ارتفاع در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و بادنجان مایه‌زنی‌شده با Gm را گزارش کرده‌اند. در این مطالعه مشخص شد که مایه‌زنی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌تواند باعث افزایش غلظت کلروفیل در مقایسه با شاهد و تیمار مایه‌زنی با Fus شود که این نتایج با نتایج تحقیق انجام‌شده در مورد لوبیای درختی (*Sesbania* spp.) کلنیزه‌شده با *G. macrocarpum*، گیاهچه‌های ماش مایه‌زنی‌شده با G. clarum، گیاهان ذرت مایه‌زنی‌شده با *G. mosseae* و یونجهٔ پاکلاغی مایه‌زنی‌شده با G. intraradices مطابقت داشت (Giri and Mukerij, 2004 ; Rabie and Almadini, 2005 ; Sheng *et al*., 2008). در این تحقیق مشخص شد که حضور قارچ فوزاریوم می‌تواند باعث کاهش کلنیزاسیون ریشهٔ نخودفرنگی توسط Gm، Gi و Gm+Gi شود. کاراگیاندیس و همکاران (Karagiannidis

et al., 2002) به کاهش معنی‌دار میزان کلنیزاسیون Gm در ریشه‌های گوجه‌فرنگی و بادنجان در نتیجهٔ مایه‌زنی با *V. dahliae* اشاره کرده‌اند. تحقیقات گارمندیا و همکاران (Garmendia *et al*., 2004) نیز حاکی از کاهش درصد کلنیزاسیون سه گونهٔ Gm، *G. deserticola* و *G. intraradices* در ریشه‌های فلفل پس از مایه‌زنی *V. dahliae* بود که دلیل آن را رقابت میان بیمارگر و قارچ میکوریزی برای فضا و یا منابع غذایی ذکر می‌کنند. ژنگ و همکاران (Zheng *et al*., 2005) نیز کاهش جزئی میزان کلنیزاسیون *G. intraradices* را پس از مایه‌زنی *P. capsici* در فلفل گزارش و دلیل آن را وجود رقابت موضعی بیمارگر و قارچ میکوریز آربوسکولار عنوان کرده‌اند. همچنین، آن‌ها کاهش چشمگیر مرگ و میر فلفل‌های میکوریزی را بر اثر *P. capsici* گزارش کرده‌اند و این کاهش را نتیجهٔ افزایش مقاومت در حضور قارچ میکوریز آربوسکولار می‌دانند. براساس مقایسهٔ میانگین‌ها، در گیاهان مایه‌زنی‌شده با فوزاریوم اِعمال هر کدام از تیمارهای مربوط به قارچ‌های میکوریزی باعث کاهش درصد کلنیزاسیون فوزاریوم و شدت بیماری ناشی از آن شدند.

نتایج این تحقیق با نتایج ژنگ و همکاران (Zheng *et al*., 2005) با قارچ میکوریز G. intraradices و عامل بیمارگر P. ca psici روی فلفل و پوزو و همکاران (Pozo *et al*., 1999, 2002) با *P. parasitica* روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی مطابقت دارد. براساس نظر بودکر و همکاران (Bodker *et al*., 1998) نیز رقابت میان قارچ‌های میکوریز داخلی و بیمارگر برای اشغال محل‌های روی ریشه از جمله دلایل کاهش شدت پوسیدگی ریشه در نخودهای میکوریزی است. از طرفی ترکیبات ضد میکروبی که توسط گیاه تولید می‌شود نیز در این مورد نقش دارند که این موضوع را مراندی و همکاران و کوردیه و همکاران نیز گزارش کرده‌اند (Cordier *et al*., 1998, M orandi *et al*., 1984). بسیاری از مطالعات انجام‌شده بر قارچ‌های AM نشان می‌دهند که قارچ‌های میکوریز داخلی به‌طور مؤثر می‌توانند باعث کاهش میزان بیماری‌های ناشی از قارچ‌های خاک‌برد و در نتیجه کاهش شدت بیماری شوند (Zambolim *et al*., 1983 ; Caron *et al*., 1986).

در این مطالعه Gm در مقایسه با Gi و ترکیب Gm+Gi تأثیر بیشتری بر فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده نشان داد. بررسی‌های انجام‌شده نشان می‌دهند که اگر بیش از یک عامل بیوکنترل در منطقهٔ ریزوسفر استفاده شود، ممکن است با توجه به تأثیرات مثبت و منفی آن‌ها بر یکدیگر، میزان عملکرد و کارایی آن‌ها تحت تأثیر قرار گیرد. به‌عنوان مثال دو میکروارگانیسم که یک منطقهٔ به‌خصوص از ریشه را کلنیزه می‌کنند یا دارای یک زیست‌خوان (نیچ اکولوژیکی) و نیاز تغذیه‌ای مشترک هستند، می‌توانند در زمینه‌های گفته‌شده با یکدیگر رقابت کنند و فعالیت و عملکرد یکدیگر را افزایش یا کاهش دهند (Janisiewicz and Bors 1995; Raaijmakers *et al*., 1995). چنین وضعیتی برای دو گونهٔ Pseudomonas putida و P fluorecence بر روی ریشهٔ تربچه گزارش شده است، در این مورد مشاهده شده است که کلنیزاسیون ریشهٔ تربچه توسط *P. putida* باعث کاهش میزان کلنیزاسیون آن باگونهٔ *P. fluorecence* و در نتیجه کاهش عملکرد آن می‌شود (Raaijmakers *et al*., 1995). نتایجی مشابه نیز در مورد تأثیر منفی برخی گونه‌های سودوموناس بر قارچ *Trichoderma harzianum* گزارش شده است (Hubbard *et al*., 1983). مطالعات نشان می‌دهند که برهم‌کنش‌های اختصاصی بین عوامل بیوکنترل می‌توانند در سرکوب‌کردن بیمارگرهای مختلف مؤثر باشند و اگر موجودات انتخاب‌شده برای مطالعات بیوکنترل تنوع ژنتیکی بیشتری داشته باشند علاوه بر دوام بیشتر در منطقهٔ ریزوسفر فرایندهای متفاوتی نیز برای کنترل بیمارگر و کاهش بیماری خواهند داشت (Pierson and Weller, 1994). در این مطالعه از دو گونهٔ *Glomus* استفاده شد که با توجه به اینکه هر دو جدایه از یک جنس هستند، می‌توانند مکانیسم‌های نسبتاً مشابه‌ای را در کنترل بیماری داشته باشند یا حتی مناطق مشابه‌ای از ریشه را کلنیزه کنند. هرچند نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که *G. mosseae* نسبت به *G. intraradices* در کاهش بیماری و افزایش شاخص‌های رشد گیاه نخودفرنگی مؤثرتر عمل می‌کند، ترکیب آن با گونهٔ *G. intraradices* باعث کاهش کارایی آن شد. پس، ممکن است که گونهٔ *G. intraradices* با کلنیزه‌کردن

ریشهٔ نخودفرنگی باعث کاهش سطح کلنیزاسیون ریشه توسط *G. mosseae* شود و در نتیجه از کارایی آن در کاهش بیماری پوسیدگی ریشه و بهبود شاخص‌های رشد بکاهد.

در این تحقیق افزایش وزن خشک ریشه‌ها در گیاهان نخودفرنگی میکوریزی مشاهده شد. علاوه بر این ممکن است فعال‌شدن سایر ساز و کارهای دفاعی گیاهان میکوریزی در بیوکنترل پوسیدگی فوزاریومی ریشه مؤثر باشند. در مجموع و براساس نتایج به‌دست‌آمده پیشنهاد می‌شود که در مطالعات تکمیلی نقش ترکیبات پروتئینی، فیتوالکسین‌ها و همچنین، تأثیر عناصر غذایی به‌خصوص ترکیباتی که در سیستم دفاعی گیاه نقش بیشتری دارند، در برهم‌کنش قارچ‌های میکوریزی و بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه بررسی شوند تا براساس آن بتوان سایر ساز و کارهای مؤثر در بیوکنترل و همچنین، شرایط مناسب برای مقاومت به بیماری را نیز مشخص کرد. همچنین، پیشنهاد می‌شود که تأثیر گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریزی به‌خصوص گونه‌های مختلف *Glomus* در مبارزهٔ زیستی علیه بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه ارزیابی شده و از بین آن‌ها بهترین و مؤثرترین گونه برای چنین مطالعاتی انتخاب و تکثیر شود.

REFERENCES

Abdel-Fattah GM, Shabana YM (2002) Efficasy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of plant Disease Protection 109: 207-215.

Al-Askar AA, Rashad YM (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi: a biocontrol agent against common bean *Fusarium* root rot disease**.** Plant Pathology 9(1): 31-38.

Al-Karaki GN, Hammad R (2001) Mycorrhiza influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under water stress. Journal of Plant Nutrition 24: 1311- 323.

Barea JM, Jeffries P (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. *In:* Hock B, Varma A (eds.), Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology, Heidelberg, Springer. pp: 521-559.

Behboudian MH, Walker RR, Torokfalvay E (1986) Effect of water stress and salinity on photosynthesis of pistachio. Scientia Horticulturae 29: 251-261.

Bodker L, Kjoller R, Kristensen K (2002) Interactions between indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and *Aphanomyces euteiches* in field-grown pea. Mycorrhiza 12: 7-12.

Caron M, Fortin JA, Richard C (1986) Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes over a 12-week period. Canadian Journal of Botany 64: 552-556.

Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant–Microbe Interactions 11: 1017-1028.

El-Haddad SA, Abd El-Megid MS, Shalaby OY (2004) Controlling onion white rot by using Egyptian formulated endo-mycorrhiza (Multi-VAM). Annals of Agriculture Science 49: 733-745.

Fillion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare H (2003) Quantification of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolation on selective media. Phytopathology 93: 229-235.

Garmendia I, Goicoechea N, Aguirreolea J (2004) Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against Verticillium wilt. Biological Control 31: 296-305.

Giri B, Mukerji KG (2004) Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptaica* and *Sesbania grandiflora* under field condition: Evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. Mycorrhiza 14: 307-3012.

Harrier LA, Watson CA (2004) The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. Pest Management Science 60: 149-157.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soil**.** California Agricultural Experiment Station Circular 347: 1-32.

Hubbard JP, Harman GE, Hadar Y (1983) Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum* , on pea seeds. Phytopathology 73: 655–659.

Hwang SF, Chang FA, Chakravarty P (1992) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of verticillium and fusarium wilts of alfalfa. Plant Disease 76: 239-243.

Janisiewicz WJ, Bors B (1995) Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound invading postharvest pathogens of fruits. Applied and Environmental Microbiology 61: 3261–3267.

Karagiannidis N, Bletsos F, Stavropoulos N (2002) Effect of verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and Mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. Science of Horticulture 94: 145-156.

Kirk JTO (1968) Studies on the dependence of chlorophyll synthesis on protein synthesis in *Euglena gracilis* together with a nonogram for determination of chlorophyll concentration. Planta 78: 200-207.

Kormanik PP, MC Graw AC (1982) Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. *In:* Schenk NC (ed.), Methods and principles of mycorrhizal research. APS Press, St . Paul Minnesota, USA. pp: 37-45.

Morandi D, Bailey JA, Gianinazzi-Pearson, V (1984) Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Physiological Plant Pathology 24: 357-364.

Naseby DC, Pascual YA, Lynch JM (2000) Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. Journal of Applied Microbiology 88:161–169.

Nene YL, Reddy MV, Haware MP, Ghanekar AM, Amin KS (1991) Field Diagnosis of Chickpea Disease and their Control. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 56 p.

Pierson EA, Weller DM (1994) Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84:940-947.

Pozo MJ, Azcon-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1999) β-1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/ or *Phytophtora parasitica* and their possible involvement in bioprotection**.** Journal of Plant Science 141: 149-157.

Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianiazzi S, Barea JM, Azcon-Aguilar C (2002) Localised versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. Journal of Experimental Botany 53: 525–534.

Pozo MJ, Dumas-Gaudot E, Slezack S, Cordier C, Asselin A, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Azcon-Aguilar C, Barea JM (1996) Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Agronomie 16: 689-697.

Raaijmakers JM, Van der Sluis I, Koster M, Bakker PAHM, Weisbeek PJ, Schippers B (1995) Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. Canadian Journal of Microbiology 41:126-135.

Rabie GH, Almadini AM (2005) Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. African Journal of Biotechnology 4: 210-222.

Schwarzott D, Walker C, Schüßler ER (2001) *Glomus,* the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 190-197.

Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y (2008) Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18: 287-296.

Singh R, Adholeya A, Mukerji KG (2000) Mycorrhiza in control of soil-borne pathogens. *In:* Mukerji KG, Chamola BP, Singh J (eds.). Mycorrhizal Biology. Kluwer Academic Publishers, New York. pp: 173-196.

Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3nd ed. Academic Press.

Trotta A, Varese GC, Gnavi E, Fusconi A, Sampo S, Berta G (1996) Interaction between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* and the arbuscularmycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. Plant and Soil 185:199–209.

Vierheiling H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of mycorrhizal fungi in roots. Physiologia Plantarum 125: 393-404.

Westerlund FVJ, Campbell RN, Kimble KA (1974) Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64: 432-436.

Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany 82: 1198-1227.

Zambolim L, Schenck NC (1983) Reduction of the effects of pathogenic root-infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. Phytopathology 73:1402-1405.

Zheng HZ, Cui CI, Zhang YT, Wang D, Jing Y, Kim KY (2005) Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. J. Zhejiang University Science 6: 778-786.