# دور الميكوريزا في استحثاث مقاومة البندورة/الطماطم إزاء الفطر *Pythium ultimum* من خلال تنشيط إفراز هرمون ميثيل الجاسمونيك

**محمد عماد خريبة[1]، ابتسام غزال[2]، محمد فواز العظمة[3] ووفاء شومان[4]**

(1) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: Imadkhrieba@gmail.com؛

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية؛ (3) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، دمشق، سورية؛

(4) قسم العلوم الأساسية، كلية الزراعة، ومديرة مركز التقانات الحيوية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

## الملخص

**خريبة، محمد عماد، ابتسام غزال، محمد فواز العظمة ووفاء شومان. 2016. دور الميكوريزا في استحثاث مقاومة البندورة/الطماطم إزاء الفطر *Pythium ultimum* من خلال تنشيط إفراز هرمون ميثيل الجاسمونيك. مجلة وقاية النبات العربية، 34(3): 194–201.**

هدف البحث إلى دراسة تأثير فطر الميكوريزا الداخلية للحد من الإصابة بمرض موت بادرات البندورة/الطماطم من خلال تنشيط إفراز هرمون مثيل جاسمونيك المسؤول عن تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة في النبات. تم الحصول على ثمان عزلات من الفطر *Pythium* spp. من المنطقة الساحلية لسورية، وعرفت اعتماداً على التوصيف المورفولوجي والجزيئي على أنها *P. ultimum*. عزلت الميكوريزا ووصفت وفقاً لمفاتيح التصنيف المعتمدة عالمياً، وتم استكمال تأكيد التوصيف المورفولوجي بالكشف الجزيئي. حددت ستة أنواع من فطور الميكوريزا أغلبها تعود للجنس *Glomus*. تم تحضير لقاح ميكوريزي خليط من الأنواع الستة المعزولة بطريقة زراعة الأصص، وبتركيز127 بوغ/ 10غ من اللقاح. أجريت التجربة في ظروف البيت المحمي، وتضمنت خمس معاملات هي: فطر البيثيوم (P)، الميكوريزا M، البيثيوم والميكوريزا معاً عند الزراعة (M+P)، البيثيوم ثم الميكوريزا بعد أسبوعين من الزراعة (M←P)، الميكوريزا ثم البيثيوم بعد أسبوعين من الزراعة (P←M)، فضلاً عن معاملة الشاهد من دون معاملة (C). أظهرت فطور الميكوريزا كفاءة عالية في الحد من الإصابة بالممرض *P. ultimum* وتطوره في بادرات البندورة، إذ انخفضت شدة الإصابة بشكل معنوي وبنسبة 73.59%، في المعاملة (P←M) مقارنة بالشاهد المعدى (P)، وبمقدار 30.02% مقارنة مع معاملةP .تم قياس تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك باستخدام جهاز الكروموانوغرافيا السائلة عالية الادأء HPLC، وبينت النتائج زيادة ملحوظة في تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك في البادرات المتعايشة مع فطور الميكوريزا بمفردها أو المعاملة بالميكوريزا قبل الإعداء بالفطر *Pythium*، إذ ارتفع تركيز هرمون ميثيل الجاسمونيك بعد 35 يوماً في معاملة M إلى 5.09 نانوغرام/غ، وفي معاملة ميكوريزا يتبعها *P. ultimum* إلى 3.25 نانوغرام/غ، مقارنة مع معاملة الوجود المشترك للميكوريزا و*P. ultimum* معاً الذي بلغ 1.36 نانوغرام/غ.

**كلمات مفتاحية:** فطر الميكوريزا، المقاومة الجهازية المستحثة، هرمون مثيل جاسمونيك، البندورة/الطماطم، *P. ultimum*.

## المقدمة

سجلت المكافحة الحيوية إزاء مسببات الأمراض الفطرية تقدماً ملموساً في العقدين الأخيرين كونها تعتمد على تفعيل نشاط الكائنات الحية المفيدة ضد الكائنات الحية الضارة في منطقة المجموع الجذري (الريزوسفير) (1). استخدمت العوامل الحيوية في تثبيط الممرض من خلال مقدرتها على تحفيز المقاومة المستحثة في النبات المعامل بالإضافة إلى تأثيراتها المباشرة إزاء مسبب المرض (13). برزت أهمية وضع استراتيجيات بديلة عن الاستعمال الواسع للمبيدات الكيميائية لمكافحة الآفات تقوم بالأساس على استحثاث الدفاعات الذاتية داخل النبات (11). أشارت العديد من الدراسات المرجعية إلى دور فطور الميكوريزا في المكافحة الحيوية، حيث تقلل من الأضرار الناجمة عن الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة بسبب قدرتها على التعايش مع جذور النباتات وتعزيز مقاومتها ضد بعض هذه الأمراض (25). لقد كان لفطور الميكوريزا الداخلية فعالية كبيرة في مكافحة الفطر *Pythium ultimum* على نبات القطيفة *Tagetes patula* (30)، حيث أشار Larsen وآخرون (21) إلى أن إلقاح شتول نبات البندورة/الطماطم بفطور الميكوريزا قبل زراعتها في التربة تقلل من الإصابة بالفطر *Pythium aphanidermatum*. كما أشارت دراسة أخرى إلى أن إلقاح شتول نبات البندورة/ الطماطم عند زراعتها في البيوت المحمية بالفطر *G. intraradices* يقلل من الإصابة بالفطر *Pythium ultimum*

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-034.3.194201
© 2016 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

(27)، وأدى إلقاح شتول نبات الخيار بفطور الميكوريزا الداخلية VAM إلى تقليل الإصابة بالفطر *Pythium ultimum* المسبب لمرض سقوط البادرات (28). تحدث فطور الميكوريزا الداخلية تغيرات فيزيولوجية ضمن النبات ككل مما يعزز مقاومته للأمراض، وتسمى هذه الظاهرة المقاومة الجهازية المستحثة (المحفّزة) Induced systemic resistance (ISR) وهي تلك المقاومة التي تنشط في النبات نتيجة لوجود عامل الحث الذي يعمل على تحفيز المورثات المسؤولة عن المقاومة للتعبير عن أنشطة جديدة مضادة للمسببات المرضية (15). يسهم تعايش الميكوريزا مع جذور النبات بدور كبيراً في تحريض المقاومة الجهازية بتحفيز النبات على إنتاج مركبات الأثيلين Ethylene (ET) وحمض الجاسمونيك (JA) Jasmonic acid أو إنتاج حمض الساليسيليك (SA)، كما يؤدي دوراً في تحفيز إنتاج البروتينات المرتبطة بالإمراضية PRPs (26). يساعد حمض الجاسمونيك النباتات على درء المسببات المرضية، إذ إن له دوراً هاماً في إحداث الإشارات الداخلية Endogenous signals (9، 15)، وهو ينظّم مراحل نمو النبات وخصوبة الإزهار ونضج الثمار (16).

يهدف البحث إلى تقدير تأثير الميكوريزا في تنشيط إفراز هرمون ميثيل جاسمونيك في نباتات البندورة/الطماطم، ودوره في تخفيض شدة الإصابة بالفطر *Pythium ultimum*.

## مواد البحث وطرائقه

### موقع التجربة

نفذت التجربة في مشتل مخصص لإنتاج شتول البندورة/الطماطم في محطة تجارب شركة سليمان الزراعية الخاصة في منطقة جبلة – بستان الباشا، التي ترتفع عن سطح البحر 50 متراً، وتبعد 2.5 كم عن شاطئ البحر و8 كم إلى الشمال من مدينة جبلة.

### تجهيز عزلات الفطور المستخدمة بالدراسة

**تجهيز عزلة الفطر *Pythium ultimum*** – جمعت بادرات البندورة/الطماطم التي ظهرت عليها أعراض مرض سقوط البادرات من البيوت المحمية والمشاتل في المنطقة الساحلية. تم تقطيع سويقة البادرة المصابة إلى أجزاء صغيرة بطول 0.5 سم تقريباً، ثم وضعت في محلول هيبوكلوريت الصوديوم التجاري بتركيز 10% لمدة 3-5 دقائق، ثم غسلت بالماء المقطر والمعقم ثلاث مرات، بعد ذلك وضعت على أوراق ترشيح لتجف، ثم زرعت بمعدل أربع قطع ساقية في كل طبق على آغار طحين الذرة (Corn Meal Agar) CMA المعقم والمضاف له المضاد الحيوي Ampicillin (250 مغ/لتر). تم تحضين الأطباق عند 2±25 °س في الظلام لمدة أسبوع. تمت تنقية العزلات الفطرية بزرع قمم الهيفات على وسط CMA ثم أخذت القياسات البيومترية باستخدام المجهر الضوئي (تكبير ×40). تم تسجيل مواصفات كل عزلة من حيث لون المستعمرة وشكلها وطريقة النمو (منتظمة أو غير منتظمة) وصفات المشيجة وقطر الهيفا وشكل الكيس البوغي وقطره وشكل البوغ البيضي وقطره والعضو الجاميتي المؤنث والعضو الجاميتي المذكر ومعدل النمو اليومي للمستعمرة. تم التوصيف المورفولوجي بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي ذكرها Teymoori وآخرون (31)، وبالنتيجة تبين أن كل العزلات تابعة للنوع *P. ultimum* (2). تم التأكد من التصنيف المورفولوجي للنوع بالتوصيف الجزيئيً باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) وبوجود بادئات من الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS) للـــ RNA الريبوزومي مميزة للنوع *P. ultimum*، وبإجراء التتابع النيكلوتيدي للعزلات ومقارنتها بالعزلات المسجلة في البنك الجيني للمورثات NCBI (18).

تم اختبار القدرة الإمراضية للفطر *P. ultimum* باستخدام صواني الاستنبات المقسمة إلى عيون (عدد 200 عين) بقياس 4 × 4 سم، حيث تم تعبئة العيون بتربة معقمة وترطيبها بالماء، وإجراء الإعداء بإضافة لقاح الفطر الممرض *P. ultimum* إلى التربة في صواني الاستنبات بنسبة 10 تربة: 1 لقاح، بوجود 4 مكررات، وكل مكرر يتضمن 5 نباتات. بعد 3 أيام من إجراء الإعداء، تمت زراعة بذور البندورة/الطماطم بمعدل بذرة في كل عين (استخدم بذور الهجين هدى، وهو من أكثر الهجن المزروعة في البيوت المحمية في الساحل السوري)، غطيت الصواني ببلاستيك شفاف للحفاظ على رطوبة الوسط في ظروف المختبر. تم اختيار العزلة الأكثر شراسة لاستخدامها في تحضير اللقاح الفطري للنوع *P. ultimum* (2).

**تحضير لقاح الفطر *P. ultimum*** – تم تحضير لقاح الفطر *P. ultimum* بتنميته على بذور الدخن، حيث أخذ 100 غ من بذور الدخن، وأضيفت إلى 50 مل من الماء، وضعت في حاويات زجاجية حجمها 1 لتر، ثم عقمت في الأوتوكلاف لمدة 90 دقيقة ولمرتين متتاليتين، عند حرارة 121 °س وضغط واحد بار. تم إلقاح الحاويات بالفطر *P. ultimum* باستخدام قطع من الآغار بقطر5 مم من مستعمراته على الوسط CMA بعمر 10 أيام، وحضنت الحاويات في الظلام، لمدة أسبوعين عند 2±25 °س (31). أضيف لقاح الفطر *P. ultimum* إلى الأصيص بمعدل 0.5% (0.5 غ من مستنبت اللقاح

للفطر *P. ultimum* بعد تجفيفه هوائياً لكل 100 غ من وسط الزراعة) (8).

**تحضير لقاح فطور الميكوريزا** – استخدمت ست عزلات محلية من فطور الميكوريزا المتعايشة مع جذور نبات البندورة/الطماطم، تم عزلها من التربة المحيطة لنبات البندورة/الطماطم في المنطقة الساحلية، ووصفت مورفولوجياً وفقاً لمفاتيح التصنيف المعتمدة عالمياً (29)، وبمساعدة اختصاصين من مركز بحوث وقاية النبات في طهران (3)، كما تم توصيفها جزيئياً باستخدام تقانة الفاصل الداخلي المستنسخ (ITS) للـــ RNA الريبوزومي باستخدام البادئتين المتخصصتين ITS1, ITS4 (نتائج غير منشورة). حضر اللقاح الميكوريزي باستخدام تقنية زراعة الأصص Pot Culture بالإعتماد على نباتات الذرة الشامية *Zea mays* (4، 17)، وذلك بإكثار ستة أنواع من فطور الميكوريزا الشجيرية الحويصلية AMF والتي عزلت سابقاً من مناطق زراعة البندورة في الساحل السوري، وتم تصنيفها في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية وبالتعاون مع مركز بحوث أمراض النبات في طهران (3):

- *Simiglomus hoi* (Berch and Trappe). Silva, Oehl and Sieverd.
- *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd and Trappe emend. C. Walker and Koske.
- *Paraglomus laccatum* (C. Walker) Morton and Redecker.
- *Septoglomus constrictum* (Trappe) Sieverd. Silva and Oehl.
- *Claroideoglomus etunicatum* Becker and Gerdeman.
- *Glomus clarum* Nicolson and Schenck.

يتكون اللقاح من جذور نبات الذرة المتعايشة مع فطور الميكوريزا والتربة المحيطة بالجذر الحاوية على أبواغ الميكوريزا، وهو عبارة عن لقاح خليط بنسب مختلفة من أنواع فطور الميكوريزا الشجيرية الموصفة سابقاً (3) والذي يحتوي على 129±12.8 بوغ/100 غ من اللقاح، ونسبة استعمار ميكوريزي لجذور نباتات الذرة الشامية قدرها 54.4%.

**دراسة فعالية الميكوريزا الشجيرية AMF في تحفيز المقاومة المستحثة إزاء الفطر *P. ultimum* من خلال تنشيط إفراز هرمون ميثيل الجاسمونيك**

زرعت بذور البندورة/الطماطم من الهجين "هدى" في أصص بلاستيكية بقطر 12 سم (2 ليتر) تحتوي على وسط الزراعة المعقم (تورب : تربة، 1 : 1) (تربة معقمة حيث عوملت بالأتوكلاف عند 121 °س لمدة 30 دقيقة)، بمعدل بذرة في كل أصيص. وقد تمّ استخدام 100 غ من اللقاح الميكوريزي للأصيص الواحد.

صممت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة حيث وزعت التجربة في خمس معاملات هي:

- المعاملة الأولى (P): شاهد تربة معداة بفطر *P. ultimum* فقط، عند زراعة البذور.
- المعاملة الثانية (M): شاهد تربة معداة بفطور الميكوريزا فقط، عند زراعة البذور.
- المعاملة الثالثة (M+P): تربة معداة بفطور الميكوريزا و*P. ultimum* معاً عند زراعة البذور.
- المعاملة الرابعة (P←M): تربة معداة بفطور الميكوريزا عند زراعة البذور وبفطر *P. ultimum* بعد أسبوعين من زراعة البذور.
- المعاملة الخامسة (M←P): تربة معداة بفطر *P. ultimum* عند زراعة البذور وبفطور الميكوريزا بعد أسبوعين من زراعة البذور.
- الشاهد السليم (C): تربة معقمة خالية من الفطور.

زرع مكرران لكل معاملة، وتضمّن كل مكرر ستة أصص. زرعت الأصص بتاريخ 2013/10/5، وقدّرت قيمة شدة الإصابة في ظروف المشتل وفقاً لدرجات سلم شدة المرض التالي (23): 0= لا توجد أعراض إصابة على بادرة البندورة/الطماطم (بادرة سليمة)؛ 1= تقزم واصفرار المجموع الخضري للبادرة دون حدوث سقوط للبادرات؛ 2= سقوط البادرات بعد انبثاقها من سطح التربة (تحلل مائي في السويقة مكان اتصال الساق بالجذر وتضيق بهذه المنطقة)؛ 3= موت البادرات قبل انبثاقها فوق سطح التربة (تعفن البذور أو موت البادرات قبل بزوغها فوق سطح التربة).

حسبت شدة الإصابة في نهاية التجربة باستخدام المعادلة التالية:

$$R\% = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100$$

حيث R% =النسبة المئوية لشدة الإصابة، a= درجة الإصابة وفقا لسلم شدة المرض، b= عدد النباتات المصابة بهذه الدرجة في كل مكرر/ معاملة، N= عدد النباتات الكلي، K= أعلى درجة في سلم شدة المرض وتساوي 3 في السلم الأول، و4 في السلم الثاني (24).

أخذت أول مجموعة من العينات للدراسة من بادرات البندورة/الطماطم (التلقيح بالميكوريزا في أصص صغيرة) بعد ظهور

البادرات بـــ 14 يوماً، والمجموعة الثانية بعد 21 يوماً، والثالثة بعد 28 يوماً، والرابعة بعد 35 يوماً. لقياس تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك خلال فترة نمو البادرة وضمن المعاملات المختلفة.

**تقدير تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك MeJA في أنسجة نبات البندورة/الطماطم**

استخلص هرمون ميثيل جاسمونيك MeJA بطريقة ثنائي كلوريد الميثان حسب Liu وآخرون (22)، حيث جمعت أوراق بعض النباتات بشكل عشوائي من كل معاملة على حدة، وطحن 500 مغ من عينة الأوراق الطازجة بسائل الاستخلاص حجمه 5 مل (1 أسيتون:1 ميثانول) وتركت العينات المطحونة طوال الليل عند 4 س°، ثم عرّضت للطرد المركزي بسرعة دوران 4800 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ,وعند 4 °س، وجمع الوسط السائل العلوي في أنابيب Eppendorf 1.5 مل وأعيد استخلاص الراسب باستخدام 200 ميكرولتر من سائل الاستخلاص، جمع بعدها السائل من جديد واستبعد الراسب وجفف المستخلص هوائياً بتركه طوال الليل عند 4 °س، ثم أذيبت المواد المتبقية بعد التجفيف بـــ 1 مل من محلول فوسفات الصوديوم 0.1M (pH= 7.8).

أعيد استخلاص الوسط الجديد مرتين باستخدام ثنائي كلوريد الميثان بالطرد المركزي، حيث فصل الوسط المائي عن الوسط العضوي في المرتين، وجمع كل وسط على حدة في أنبوب بمفرده، عدّل pH المستخلص المائي إلى 2 بإضافة حمض كلور الماء HCl (6 مولار)، وأعيد استخلاص الوسط المائي مرتين بوساطة الهكسان ومرتين بوساطة ثنائي كلوريد الميثان، حيث تعادل كمية المذيب العضوي المضاف بالاستخلاص في كل مرة كمية الوسط المستخلص الذي تمت عملية الاستخلاص منه، وبعد ذلك تكون العينة جاهزة للحقن والتحليل، حقن 20 ميكروليتر من العينة في جهاز الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء High-performance liquid chromatography (HPLC).

تم حقن 20 ميكرولتر من المادة القياسية وهي ميثيل جاسمونيك عيار 95% (مصدره شركة Sigma) في جهاز الكروماتوغرافيا السائلةHPLC وذلك قبل حقن المستخلص النباتي الحاوي على هرمون ميثيل الجاسمونيك، للتعرف على زمن ومساحة القمة التي تشير إلى وجود هرمون ميثيل الجاسمونيك في العينات المدروسة. قيس تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك وفق الطريقة الموصوفة من قبل Kramell وآخرون (20) باستخدام جهاز HPLC، ضمن الشروط التالية: عمود الفصل سيلكا C18، بمواصفات (4.6×250 mm, 5 µm)، حرارة 35 °س، الطور المتحرك Mobile phase (ماء: أسيتونتريل) (60:40)، pH= 2.6 للوسط المذيب بإضافة حمض الخل الثلجي، معدل التدفق 0.5 مل/1 دقيقة، الكشف بوساطة الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 195 نانومتراً عند زمن امتصاص 15.50 دقيقة. وبالتالي تم حساب تركيز (C) هرمون ميثيل الجاسمونيك وفقاً للمعادلة التالية حسب Kimura وآخرون (19):

$$RF= \frac{RF.\ Vext.Area}{Vinj.Ws}$$

حيث C (Concentration)= تركيز هرمون ميثيل الجاسمونيك ويقدر بـــــ ng/g (نانوغرام من هرمون ميثيل الجاسمونيك في 1 غ من النسيج النباتي)؛ RF (Retention Factor)= معامل الاحتفاظ، قيمة ثابتة تتعلق بالمادة القياسية وهي ميثيل جاسمونيك عيار95% (مصدرها شركة Sigma-Aldrich) ويحسب من المعادلة التالية:

$$RF= \frac{Vinj.Co}{Area.St}$$

Vinj= حجم المادة القياسية المحقونة في جهاز HPLC وتعادل 20 ميكرولتر؛ Co= تركيز المادة القياسية (Methyl jasmonate) والذي يبلغ $44.8\times10^{3}$ mg/ml؛ Area= مساحة المنحني بالمادة القياسية والذي بلغ 36489803.17؛ Vext= حجم الخلاصة للعينة بعد عملية الاستخلاص والذي بلغ 250 ميكرولتر؛ Ws= وزن العينة الأولية التي استخلص منها المركب، وحسبت قيمة RF وبلغت $246\times10^{-8}$.

**التحليل الإحصائي**

نفذت التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R.C.B.D.) Randomized Complete Block Design. وحللت النتائج إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي CO-STAT 6.4 (http://www.cohort.com). اختبرت الفروق بين المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference Test عند مستوى احتمال 0.05، حيث ميزت المتوسطات المختلفة فيما بينها معنوياً بحروف هجائية مختلفة.

## النتائج والمناقشة

**تأثير إضافة الميكوريزا الشجيرية في متوسط نسبة الإنبات والنسبة المئوية لسقوط بادرات البندورة/الطماطم وشدة الإصابة في المعاملات المدروسة**

أظهرت النتائج (جدول 1) تبايناً واضحاً في النسبة المئوية للإنبات ولسقوط البادرات في المعاملات المختلفة، حيث بلغت أعلى نسبة

للإنبات في معاملة M 100% وفي معاملة P←M 91.66% وفي معاملة P+M 75%، وأدنى نسبة في معاملة P (41.66%) مقارنة مع الشاهد السليم C. أوضحت النتائج أن معاملة P←M أدت لإرتفاع في نسبة إنبات البذور معنوياً بمقدار 54.54%، ومعاملة M+P بنسبة 44.45% مقارنة مع معاملة P.

أظهرت النتائج أن أعلى نسبة لسقوط البادرات كانت في معاملة P حيث بلغت 91.66% في حين وجدت أدنى نسبة في معاملة P←M (8.3%)، التي خفضت معنوياً من نسبة سقوط البادرات بمعدل 90.94%، وكذلك معاملة M+P (50%) بمعدل 45.45% مقارنة مع معاملة P.

بينت النتائج (جدول 1) بأن المعاملة التي أضيف إليها ميكوريزا أثناء زراعة البذور وبعدها بأسبوعين أضيف فطر *P. ultimum* (P←M) (22%) قد أظهرت تأثيراً أكبر في تخفيض شدة الإصابة بشكل معنوي ووصلت نسبتها حتى 73.59% مقارنة بالشاهد المعدى بالكائن الممرض (P) (83.3%)، بينما انخفضت شدة الإصابة معنوياً في معاملة الوجود المشترك للميكوريزا والكائن الممرض أثناء زراعة البذور P+M (85.3%) بمقدار 30.02% مقارنة مع معاملة P.

أظهرت النتائج أن إضافة اللقاح الميكوريزي إلى مرقد زراعة البذور في التجربة أدت إلى زيادة في نسبة إنبات البذور وخفضّت من نسبة سقوط البادرات في معاملة P←M وفي معاملة P+M، وهذا ما أكده Fabbro و Prati (10) اللذان وجدا أن إضافة الميكوريزا أثناء زراعة البذور خفّض من شدة الإصابة بالفطر *P. ultimum*، فزادت نسبة إنبات البذور وخفّض من نسبة الإصابة بمرض سقوط البادرات، حيث تعمل فطور الميكوريزا المتعايشة مع الجذور على حماية البادرة من الكائن الممرض *P. ultimum* في الأيام الأولى من نموها. توافقت النتائج التي توصلنا إليها من حيث زيادة نسبة إنبات البذور مع ما توصل إليه Graham و Yoshimura (12) في بحثهما حول قدرة فطور الميكوريزا على الحد من الإصابة بالفطر *Pythium* على نبات البندورة/الطماطم، وزيادة نسبة الإنبات في معاملة ميكوريزا + *Pythium* إلى 50%. وقد تعود زيادة نسبة الإنبات وخفض نسبة سقوط البادرات في النباتات الملقحة بالميكوريزا الشجيرية AM إلى ما تفرزه الميكوريزا من مواد ومنظمات نمو تحفز إنبات البذور ونمو البادرات، وتزيد من إتاحة بعض العناصر الغذائية كالفوسفور للنبات مما يؤدي إلى حصول نمو خضري جيد يجعل النبات أكثر مقاومة للإصابة بالممرض، ويلغي جانباً كبيراً من تأثير الكائن الممرض في النبات، وإلى تنشيط إفراز بعض الهرمونات النباتية مثل هرمون الجاسمونيك وميثيل الجاسمونيك اللذين ينشطا المقاومة الجهازية المستحثة في النبات وبعض الإنزيمات الدفاعية مثل البيروكسيداز والكيتيناز والبولي فينول أوكسيداز(5، 21).

**جدول 1.** تأثير إضافة الميكوريزا الشجيرية في متوسط نسبة الإنبات والنسبة المئوية لسقوط بادرات البندورة/الطماطم وشدة الإصابة في المعاملات المدروسة.

**Table 1.** Effect of mycorrhiza on the average germination rate and the seedlings damping-off level (%) of tomatoes and severity of infection in response to the tested treatments.

| شدة الإصابة (حسب سلم 1-4) Disease severity (1- 4 scale) | سقوط البادرات% Damping-off % | الإنبات % Germination % | Treatments | المعاملات |
|---|---|---|---|---|
| d 0.00 | c 0.00 | ab 91.66 | Control (clean Soil) | تربة معقمة خالية من الفطور |
| d 0.00 | c 0.00 | a 100.00 | Soil inoculated only with mycorrhiza at sowing | شاهد تربة معداة بفطور الميكوريزا فقط، عند زراعة البذور |
| a 83.33 | a 91.66 | c 41.66 | Soil inoculated only with *Pythium* at sowing | شاهد تربة معداة بفطر *P. ultimum* فقط، عند زراعة البذور |
| c 22.00 | c 8.30 | a 91.66 | Soil inoculated with mycorrhiza at sowing and two weeks later with *Pythium* | تربة معداة بفطور الميكوريزا عند زراعة البذور وبفطر *P. ultimum* بعد أسبوعين من زراعة البذور |
| b 58.31 | b 50.00 | b 75.00 | Soil inoculated with *Pythium* and mycorrhiza at sowing | تربة معداة بفطور الميكوريزا و*P. ultimum* معاً عند زراعة البذور |
| a 83.33 | a 83.33 | c 41.66 | Soil inoculated with *Pythium* at sowing and two weeks later by mycorrhiza | تربة معداة بفطر *P. ultimum* عند زراعة البذور وبفطور الميكوريزا بعد أسبوعين من زراعة البذور |
| 11.12 | 25.67 | 20.96 | LSD at P= 0.05 | أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% |

القيم في العامود نفسه المتبوعة بالأحرف نفسها لا يوجد بينها فرق معنوي عند احتمال 0.05.

Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at P=0.05.

**فعالية الميكوريزا الشجيرية AMF في تنشيط إفراز هرمون ميثيل جاسمونيك**

أظهرت نتائج قياس تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك MeJA في نباتات التجربة (جدول 2) بعد 14 يوماً من ظهور البادرات تبايناً في تركيز الهرمون ما بين المعاملات المدروسة، حيث كان 2.52 نانوغرام/غ في معاملة M، و1.43 نانوغرام/غ في معاملة P←M مع وجود فروق معنوية بين المعاملتين، فقد تبين ارتفاع مستوى ميثيل جاسمونيك بصورة معنوية في معاملة P←M بنسبة 27.97%، مقارنةً مع معاملة M+P (1.03 نانوغرام/غ).

عند قياس تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك بعد 21 يوماً من ظهور البادرات، تبين ارتفاع في نسبته بالمعاملة M (4.01 نانوغرام/غ) وتفوقها معنوياً على كافة المعاملات الأخرى. حيث بلغ تركير ميثيل الجاسمونيك في معاملة P←M (2.33 نانوغرام/غ)، التي تفوقت معنوياً بنسبة 41.63% على معاملة M+P (1.36 نانوغرام/غ) (جدول 2)، وترافق ارتفاع تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك مع انخفاض شدة الإصابة في معاملة P←M، كما أن عدم زيادة محتوى الأوراق من ميثيل الجاسمونيك في معاملة P ومعاملة M+P بعد 21، 28، 35 يوماً من الإنبات (جدول 2) قد يكون نتيجة تطور الكائن الممرض وتأثيره في البادرة حيث تصبح غير قادرة على القيام بوظائفها الحيوية (7).

ازداد تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك بعد 28 يوماً من إنبات البذور في معاملة M (4.284.28 نانوغرام/غ) بنسبة 24% مقارنةً مع معاملة P←M (3.2 نانوغرام/غ) في حين كان التركيز في معاملة M+P هو 1.36 نانوغرام/غ (جدول 2). بينت النتائج ارتفاع تركيز هرمون ميثيل جاسمونيك بعد 35 يوماً من إنبات البذور في معاملة (M) (5.09 نانوغرام/غ) وتفوقها معنوياً على معاملة P←M (3.25 نانوغرام/غ) بنسبة 36.14%، كما تفوقت معنوياً على بقية المعاملات الأخرى، وقد ارتفع تركيز ميثيل جاسمونيك في المعاملة (P←M) بنسبة 60% مقارنةً بمعاملة (M+P) (1.36 نانوغرام/غ)، وهذا ما أكده Dehne (7) في بحثه حول قدرة فطور الميكوريزا في الحد من الإصابة بممرضات التربة، وتعود هذه القدرة في حماية البادرات وتثبيط الممرض إلى دورها في تنشيط إفراز بعض الهرمونات النباتية مثل الجاسمونات Jasmonates وتنشيط إفراز بعض الإنزيمات مثل البيروكسيداز (6). تتفق نتائج قياس تركيز هرمون ميثيل الجاسمونيك مع نتائج Herrera-Medina وآخرون (14) حيث أظهر أن تعايش الميكوريزا الشجيرية مع جذور بادرات النباتات أدت إلى وجود مستوى عال من هرمون ميثيل جاسمونيك MeJA والتي هي عبارة عن هرمونات نباتية تنظم رد فعل النبات نحو الكائنات الممرضة.

**جدول 2.** محتوى هرمون ميثيل جاسمونيك (MeJA) في نباتات البندورة/الطماطم في المعاملات المختلفة بعد 14 إلى 35 يوم من الزراعة.

**Table 2**. Methyl Jasmonic (MeJA) hormone content in tomato plants in various treatments 14 to 35 days after planting.

| محتوى النبات من MeJA (نانوغرام/غرام) Plant content of MeJA (ng/g) | المعاملة* Treatment* | الزمن (يوم) Time (day) |
|---|---|---|
| 1.200 hi | C | 14 |
| 2.520 de | M | |
| 0.063 j | P | |
| 1.430 gh | M→P | |
| 1.030 i | M+P | |
| 0.061 j | P→M | |
| 1.850 f | C | 21 |
| 4.010 b | M | |
| 0.023 j | P | |
| 2.330 de | M→P | |
| 1.360 gh | M+P | |
| 0.076 j | P→M | |
| 2.230 e | C | 28 |
| 4.230 b | M | |
| 0.023 j | P | |
| 3.250 c | M→P | |
| 1.460 g | M+P | |
| 0.060 j | P→M | |
| 2.600 d | C | 35 |
| 5.090 a | M | |
| 0.047 j | P | |
| 3.250 e | M→P | |
| 1.300 gh | M+P | |
| 0.014 j | P→M | |

القيم في العامود نفسه المتبوعة بالأحرف نفسها لا يوجد بينها فرق معنوي عند احتمال 0.05.

*معاملة M= شاهد تربة معداة بفطور الميكوريزا فقط، عند زراعة البذور؛ معاملة P= شاهد تربة معداة بفطر *P. ultimum* فقط، عند زراعة البذور؛ معاملة M+P= تربة معداة بفطور الميكوريزا و*P. ultimum* معاً عند زراعة البذور؛ معاملة M→P = تربة معداة بفطور الميكوريزا عند زراعة البذور وبفطر *P. ultimum* بعد أسبوعين من زراعة البذور؛ معاملة P→M = تربة معداة بفطر *P. ultimum* عند زراعة البذور وبفطور الميكوريزا بعد أسبوعين من زراعة البذور؛ C = تربة معقمة خالية من الفطور.

Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at P=0.05.

* M= Soil was inoculated only with mycorrhiza; P= soil was inoculated only with *Pythium*; M+P= *Pythium* and mycorrhiza at sowing; M→P = mycorrhiza at sowing and two weeks later with *Pythium;* P→M = with *Pythium* at sowing and two weeks later by mycorrhiza; Control (C)= Clean Soil.

تبين من هذه النتائج أن إضافة اللقاح الميكوريزي عند زراعة بذور البندورة/الطماطم أدى إلى تنشيط المقاومة الجهازية المستحثة ISR عند النبات من خلال تنشيط إفراز هرمون ميثيل الجاسمونيك الذي ينظم رد فعل النبات اتجاه الكائنات الممرضة.

من المفيد تطوير هذه الدراسة للتعرف على حقيقة التفاعل على المستوى الجزيئي بين فطور الميكوريزا الشجيرية والممرض *P. ultimum*، والآليات التي تحكمه والتوصل إلى أنواع مناسبة من فطور الميكوريزا التي يمكنها أن تحمي النبات وتحد من إصابته بالممرض، واستمرار البحث حقلياً ومخبرياً حول مدى تأثير فطور الميكوريزا على الممرضات الأخرى المنقولة بالتربة.


## Abstract

**Khreibeh, M.E., I. Ghazal, M.F. Azmeh and W. Shuman. 2016. Effect of mycorrhiza in inducing systemic resistance of tomato against *Pythium ultimum* through activation of methyl jasmonic hormone. Arab Journal of Plant Protection, 34(3): 194-201.**

This research aimed to study the impact of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) in reducing damping-off disease in tomato through activation of methyl jasmonic hormone responsible for induced systemic resistance (ISR) in the plant. Eight isolates of the causal organism were purified and identified based on morphological and molecular characteristics. Results revealed that all the isolates were *P. ultimum*. Mycorrhizae isolates were characterized according to the international classification and confirmed by the Plant Protection Research Institute in Tehran (Iran). Six mycorrhizal fungal species of the genus *Glomus were determined*. Inoculum mixture of the six isolated mycorhiza species was prepared at a concentration of 127 spores/10 g inoculum, using pot culture protocol. The experiment was conducted under greenhouse conditions with five treatments: (P): *Pythium*, (M): mycorrhizae, (M+P): *Pythium* and mycorrhizae at seeding time, (P→M): *Pythium* then adding Mycorrhizae two weeks later, and (M→P): mycorrhizae them adding *Pythium*, two weeks later, in addition to a control treatment (C). Mycorrhizal fungi showed high efficiency in reducing *P. ultimum* incidence and development in tomato seedlings. Disease severity was significantly reduced by 73.59% in (M→P) treatment and by 30.02% in P+M compared with the positive control. Methyl jasmonic hormone activity was estimated by using high performance liquid chromatography (HPLC). Results revealed significant increase in the concentration of the methyl jasmonic hormone and the peroxides enzyme in plant seedlings coexist with mycorrhizal fungi alone or in the treatment with mycorrhizae followed by *Pythium*. Methyl jasmonic concentration increased 35 days after the M treatment to 3.25 ng/g, and to 5.90 ng/g after M→P treatment compared with the 1.36 ng/g in the M+P treatment.



**Keywords**: Mycorrhizal fungi, induced systemic resistance (ISR), methyl jasmonic hormone, tomato, *P. ultimum*.



***Corresponding author: M. Emad Khreibeh, National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria, email: Imadkhrieba@gmail.com***


## المراجع


1. **أسطيفان، زهير عزيز، محمد صادق حسن، حافظ إبراهيم عباس وباسمة جورج انطون**. 1999. تأثير فطريات المايكوريرا الداخلية على المعقد المرضي لمرض الذبول ونيماتودا العقد الجذرية في نباتات الطماطم والباذنجان، مجلة الزراعة العراقية، 4: 54-60.
2. **خريبه، محمد عماد، ابتسام غزال، فواز العظمة ووفاء شومان**. 2013a. العزل والتشخيص والشدة الإمراضية للفطر *Pythium* spp. المسبب لمرض سقوط بادرات البندورة في البيوت المحمية. مجلة جامعة تشرين للعلوم البيولوجية، 6: 181-193.
3. **خريبه، محمد عماد، ابتسام غزال، فواز العظمة ووفاء شومان**. 2013b. عزل وتحديد فطور جذرية (ميكوريزا) متعايشة مع البندورة في الساحل السوري. مجلة جامعة تشرين للعلوم البيولوجية، 8: 149-160.
4. **Brundrett, M. and S. Juniper**. 1995. Non-destructive assessment of spore germination of VAM fungi and production of pot cultures from single spores. Soil Biology and Biochemistry, 27: 85-91.
5. **Cardoso, I.M. and T.W. Kuyper.** 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. Agriculture, Ecosystems & Environment, 116: 72-84
6. **Cheong J.J. and Y.D. Choi.** 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. Trends in Genetics, 19: 409-413.


## References


7. **Dehne, H.W**. 1982. Interaction between Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology, 72: 1115-1119.
8. **Dewan, M.M**. 1988. *Pythium* spp. in root of wheat and ryegrass in Western Australia and their effect on root rot caused by *Gaummanomyces graminis* var. *tritic*. Soil Biology and Biochemistry, 6: 801-808.
9. **El-Khallal, S.M**. 2007. Induction and modulation of resistance in Tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bio agent fungi (Arbuscular Mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defense mechanism. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4: 691-705.
10. **Fabbro, C.D. and D. Prati.** 2014. Early responses of wild plant seedlings to Arbuscular Mycorrhizal fungi and pathogens. Basic and Applied Ecology, 15: 534-542.
11. **Ghaouth, A., Wilson, C.L. and M. Wisniewski.** 1998. Ultra-structural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology, 88: 282-291.

12. **Graham, S. and D.R. Yoshimura**. 2014. The *Pythium* suppressive ability of *Glomus intraradices* in cherry tomato propagation. Biological Sciences, BIO. 462: 1-16.
13. **Hanson, L.E.** 2003. Biological control of damping-off in Sugarbeet seedlings with *Trichoderma* species. poster presentations, joint IIRB-ASSBT Congress, 26th Feb-1st March, San Antonio (USA).
14. **Herrera-Medina, M.J., M.I. Tamayo, H. Vierheilig, J.A. Ocampo and J.M. Garcia-Garrido.** 2008. The jasmonic acid signaling pathway restricts the development of the Arbuscular Mycorrhizal association in tomato. Journal of Plant Growth Regulation, 27: 221-230.
15. **Kapoor, R.** 2008. Induced resistance in Mycorrhizal Tomato is correlated to concentration of jasmonic acid. OnLine Journal of Biological Sciences, 8: 49-56.
16. **Kawamura, Y., S. Takenaka, S. Hase, M. Kubota, Y. Ichinose, Y. Kanayama, K. Nakaho F.K. Daniel and H. Takahashi.** 2014. Enhanced defense responses in arabidopsis induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require. SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. Plant and Cell Physiology, 50: 924-934.
17. **Khakpou, O. and J. Khara.** 2012. Spore density and root colonization by Arbuscular Mycorrhizal fungi in some species in the northwest of Iran. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3: 977-982.
18. **Khrieba, M.I., W. Choumane, I. Ghazal and F. Azmeh.** 2015. Molecular characterization of *Pythium* spp. isolated from tomato seedlings in the Syrian coast. Journal of Life Sciences, 9: 449-455.
19. **Kimura, M., B. Delia and R**. **Amaya.** 2002. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. Food Chemistry, 3: 389-398.
20. **Kramell, R., G. Schneider and O. Miersch.** 1997. Chiral separation of amide conjugates of jasmonic acid by liquid chromatography. Chromatographia, 45: 104-108.
21. **Larsen, J., J.H. Graham, J. Cubero and S. Ravnskov.** 2011. Bio control traits of plant growth suppressive Arbuscular Mycorrhizal fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. European Journal of Plant Pathology, 133: 361-369.
22. **Liu, X., Y. Yang, W.H. Lin, J. Tong, Z. Huang and L. Xiao.** 2010. Determination of both jasmonic acid and methyl jasmonate in plant samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chinese Science Bulletin, 55: 2231-2235.
23. **McKellar, M.E. and E.B. Nelson.** 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed colonizing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 69: 452-460.
24. **Mckinney, H.H.** 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, Washington, 26: 195-217.
25. **Ortas, I.** 2010. Effect of Mycorrhiza application on plant growth and nutrient uptake in cucumber production under field conditions. Spanish Journal of Agricultural Research, 8: 116-122.
26. **Ozgonen, H., D.A. Soner and A. Erkilic,** 2010. The effects of Arbuscular Mycorrhizal fungi on yield and stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. In peanut. African Journal of Agricultural Research, 5: 128-132.
27. **Pirazzi, R., E. Rea and M. Bragaloni.** 1999. Improvement of micronutrient uptake of valuable broadleaves in interaction with *Glomus mosseae*. Geomicrobiology Journal, 16: 79–84.
28. **Rosendahl, C.N. and S. Rosendahl.** 1990. The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in controlling damping-off and growth reduction in cucumber caused by *Pythium ultimum*. Symbiosis, 9: 363-366
29. **Smith, S.E. and D.J. Read**. 2008. Mycorrhizal Symbioses. Academic Press, London, UK, 589 pp.
30. **St-Arnaud, M., C. Hamel and J.A. Fortin.** 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of Mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. Canadian Journal of Plant Pathology, 16: 187-194.
31. **Teymoori, S., Shahri, M.H., Rahnama, K. and H**. **Afzali.** 2012. Identification and pathogenicity of *Pythium* species on cantaloupe in Khorasan Razavi province of IRAN. Journal of Crop Protection, 1: 239-247.

**Received: November 28, 2014; Accepted: November 3, 2016**

**تاريخ الاستلام: 2014/11/28؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/11/3**