مقاله تحقیقی

تاثیر *Glomus intraradices* بر میزان تولید آنزیم کیتیناز درپسته تلقیح شده با *Armillaria mellea*

حسام‌الدین حسنی[۱]، محمد سالاری[۲]، مهدی پیرنیا[۳]، امیرحسین محمدی[۴]

۱، ۲ و ۳- دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل ، ایران.

۴- استادیار، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران.

مسئول مکاتبات: محمد سالاری، ایمیل: salari21m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵ ۹(۱) ۲۵-۳۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

چکیده

پسته از محصولات مهم و اقتصادی است که توسط *Armillaria mellea* مورد حمله قرار می‌گیرد و باعث کاهش چشمگیر محصول و زوال درخت می‌شود. از بیماری‌های قارچی که در سال‌های اخیر در باغات پسته رو به افزایش است، بیماری پوسیدگی ریشه می‌باشد که توسط قارچ *Armillaria mellea* ایجاد می‌شود. مکانیزم‌های گسترده و چرخه زندگی پیچیده قارچ، کنترل آن را محدود و تقریبا غیرممکن ساخته است. در این تحقیق جنبه‌های بیوشیمیایی برهمکنش قارچ همزیست ریشه*Glomus intraradices* و *A. mellea* بر روی پایه پسته *Pistachio vera* رقم بادامی زرند به عنوان پایه‌ی حساس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و به صورت فاکتوریل با چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. فعالیت آنزیم کیتیناز بر اساس میزان ان استیل گلوکز آمین آزاد شده، محاسبه شد. نتایج نشان داد کلونیزه شدن با قارچ همزیست، فعالیت‌های آنزیمی را به نفع گیاه تغییر داد که رابطه مستقیمی با درصد کلونیزاسیون قارچ همزیست با ریشه داشت. نتایج حاکی از افزایش و به حداکثر رسیدن فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ مایکوریز دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های خاکزاد، قارچ‌های مایکورایز آربوسکولار، کنترل زیستی

مقدمه

پسته یکی از محصولات باغبانی ایران بوده که سهم زیادی از صادرات غیر نفتی کشور را به خود اختصاص داده است. در مناطق پسته‌کاری ایران تنش‌های زنده (آفات و بیماری‌ها) و غیرزنده (شوری، خشکی، شرایط نامساعد جوی) همواره موجب ایجاد خسارت به درختان و کاهش محصول پسته می‌گردند (Mohammadi & Haghdel, 2016). در میان عوامل تنش‌زای زنده، بیماری‌های خاکزاد اهمیت زیادی داشته و می‌توانند باعث مرگ و میر درختان پسته شوند (Esmailpour *et al*., 2015). گونه‌های مختلف قارچ *Armillaria* (بیش از ۴۰ گونه) علاوه بر اینکه عامل پوسیدگی ریشه بیش از ۱۰۰ گونهٔ گیاهی می‌باشند، نقش مهمی به‌عنوان یک میکروارگانیسم تجزیه‌کننده در محیط دارد (Koch *et al*., 2017). پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه پسته در ایران اولین بار در سال ۱۳۸۵ از باغ‌های پسته دامغان گزارش شد و عامل آن قارچ *Armillaria mellea* معرفی گردید و البته چندین گونه دیگر از این قارچ به‌عنوان عامل خسارت شدید روی میزبان‌های بادام، توت، گیلاس، زردالو، آلو، سیب، به، مو و غیره معرفی شد که قارچ *A. mellea* از مخرب‌ترین آن‌ها به دلیل وسعت میزبانی گزارش شد (Amirahmadi *et al*., 2006). این قارچ اندام مقاومی به نام رایزومورف (Rhizomorph) تولید می‌کند، که ظاهری شبیه ریشه گیاهان دارد. این اندام یا روی بقایای گیاهی رشد کرده و یا به‌صورت اپی‌فیتی (Epiphytic) روی سیستم ریشه گیاهان میزبان مرده، بیمار یا سالم رشد می‌کند (Garet,

1960; Raabe & Trujilo, 1963; Kile, 1980; Morrison, 2004; Kubiak *et al*., 2017).

از آنجایی‌که بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه و اندام‌های مقاوم آن در خاک بسیار توسعه یافته است و نمی‌توان با استفاده از سموم آن را کنترل کرد (Labbe *et al*., 2015)، از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان خسارت ناشی از بیماری را کاهش و در تلفیق آن با استفاده از سموم، کنترل قابل توجهی را در برابر قارچ عامل بیماری ایجاد کرد. بررسی‌های متعدد نشان داد که احتمال موفقیت در کنترل این بیماری با استفاده ازمیکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به تنهایی یا به همراه سایر روش‌های کنترلی بسیار بیشتر می‌باشد (Pearce & Malajczuk, 1990; Waudo, 1994; Onsando Razique & Fox, 2004).

هدف از این تحقیق اندازه‌گیری تولید آنزیم کیتیناز در حضور *G. intraradices* توسط *P. vera* و ارزیابی میزان کلنیزاسیون قارچ همزیست در کاهش شدت بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه می‌باشد. رایزومورف‌های قارچ *A. mellea* در خاک مهمترین منبع اینوکولوم (Inoculum) قارچ در خاک بوده که دارای ساختار مقاومی در مقابل شرایط نامساعد محیطی، عوامل بیوکنترل و ترکیبات شیمیایی می‌باشد (Campbell, 1989). این خصوصیات به همراه قدرت ساپروفیتی و توانایی بالای قارچ در زنده ماندن طولانی مدت در خاک، باعث شده که کنترل این بیماری با استفاده از قارچ‌کش‌ها بسیار مشکل و در مواردی غیرممکن باشد (Razique & Fox, 2004). از سوی دیگر مطالعات مختلف نشان داده که احتمال موفقیت در کنترل این بیماری با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به تنهایی یا به همراه سایر روش‌های کنترلی بسیار بیشتر می‌باشد (Pearce & Malajczuk, 1990; Waudo, 1994; Onsando Razique & Fox, 2004). یکی از معروف‌ترین و رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، قارچ‌های مایکورایزای آربوسکولار می‌باشند، که جزء شاخه *Glomeromycota* بوده و قادر به ایجاد رابطه همزیستی و ارتباط دو طرفه‌ای میان آن‌ها با ریشه بیش از ۹۰ درصد گیاهان بازدانه، نهاندانه، سرخس‌ها و خزه‌ها می‌باشد (Smith & Read, 2008). در اکوسیستم‌های طبیعی، بیشتر سیستم‌های ریشه‌ای می‌توانند با قارچ‌های مایکورایزی همزیست شوند (Peterson *et al*., 2004). قارچ‌های مایکورایز آربوسکولار (ArbuscularMycorrhizae)(AM) تقریباً در همه خاک‌ها و مناطق گرمسیری، معتدل، سردسیری و نیز در بیشتر خاک‌های زراعی وجود دارند (Smith & Read, 2008). ارتباط دو سویه قارچ‌های مایکورایز آربوسکولار و گیاهان می‌تواند باعث افزایش سلامت گیاهان، سلامت خاک، کمک به چرخه‌ی کربن و غلبه بر تنش‌های زنده و غیر زنده شود (Azcón–Aguilar & Barea, 1996).

مواد و روش ها

آزمایش تاثیر قارچ *Glomus intraradices* بر تولید آنزیم کیتیاز در پایه پسته تلقیح شده با *A. mellea*

بذور پسته به مدت ۳۰ دقیقه در محلول وایتکس ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شده و سه مرتبه (به مدت ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شسته شدند. پس از خیساندن بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر سترون و ضدعفونی با قارچ‌کش‌های بنومیل و PCNB (Pentachloronitrobenzene)(به‌میزان دو در هزار از هرکدام قارچکش‌ها)، در پارچه ململ و ظروف پلاستیکی درب‌دار سترون و در دمای اتاق نگهداری شد. حدود ۱۰ روز بعد بذرهای جوانه‌زده یکنواخت جدا شده و در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی مخلوطی از ماسه شسته شده و خاک سترون (به نسبت ۱:۲) کاشته شد. در قسمت پایین گلدان‌ها یک لایه سه سانتی‌متری حاوی قطعه تکثیری *Glomus intraradices* (تهیه شده از شرکت زیست فناوران توران، به تایید دانشگاه شیراز دانشکده کشاورزی) درخاک ریخته شد تا پس از رشد ریشه نهال و تماس با مایه قارچ مایکورایزی، کلنیزاسیون ریشه‌ها با قارچ مذکور صورت گیرد.

جدایه *A. mellea* از پژوهشکده پسته تهیه شد و برای تهیه مایه تلقیح بیمارگر از روش Baumgartner و Rizzo (۲۰۰۶) استفاده شد. در این روش از سرشاخه‌های درختان گلابی، به یا سیب برای تکثیر مایه تلقیح *A. mellea* استفاده شد. ابتدا قطعاتی به طول دو تا سه سانتی‌متر از سرشاخه‌های جوان درختان با قطر حدود یک تا یک و نیم سانتی‌متر جدا شد و حدود ۳۰ قطعه داخل ظروف شیشه‌ای درب‌دار قرار گرفت. ظروف شیشه‌ای حاوی قطعات به مدت یک ساعت و به فاصله یک روز درمیان در سه نوبت اتوکلاو شد و در هر ظرف شیشه‌ای حدود ۳۰ بلوک به قطر یک سانتی‌متر از کشت جوان و ۹۶ ساعته قارچ *A. mellea* روی محیط کشت عصاره مالت–آگار (Malt Extract Agar=MEA) قرار داده شد. ظروف شیشه‌ای به مدت حدود شش ماه در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شد تا قطعات چوبی کاملاً با قارچ عامل بیماری کلنیزه شوند. برای مایه‌زنی از نهال‌های چهار ماهه پسته که ریشه آنها با قارچ مایکورایزی کلنیزه شد، استفاده شد. قبل از مایه‌زنی با تیغ اسکالپل، قسمت قاعدهٔ ساقه نهال‌ها زخمی شد و برای هر نهال دو قطعه سرشاخه کلنیزه شده با بیمارگر در کنار بافت زخمی قرار داده شد (Baumgartner & Rizzo, 2006). گلدان‌ها در گلخانه با شرایط دمایی ۲۹ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۸ درصد قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. تیمارهای استفاده شده در این تحقیق شامل: شاهد یا *P. vera* به تنهایی، مایه‌زنی قارچ *G. intraradices* با ریشه *P. vera* ، مایه‌زنی *A. mellea* با ریشه *P. vera*، برهمکنش قارچ *G. intraradices* و *A. mellea* با *P. vera* بودند.

به محض مشاهده علائم بیماری در نهال‌های مایه‌زنی شده با *A. mellea*، نمونه‌برداری از گیاهان انجام شد. با جداسازی اندام هوایی و ریشه نهال‌ها از محل طوقه و شستشوی کامل ریشه‌ها با آب و خشک نمودن در میان کاغذ روزنامه، با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن تر اندام هوایی و ریشه‌ها محاسبه گردید.

به‌منظور تعیین میزان فعالیت بیمارگر، میزان مرگ و میر نهال‌ها در هر تیمار محاسبه شد. قسمت‌های پایینی ساقه نهال‌ها نیز از نظر تشکیل صفحات میسلیومی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین درصد کلنیزاسیون *A. mellea*، ۴۰ قطعه پنج میلی‌متری از ریشه‌ها و قسمت قاعده‌ی ساقه‌ها به صورت تصادفی جدا شد و پس از ضدعفونی در محلول وایتکس ۱۰ درصد و شستشو با آب مقطر، روی محیط کشت BSMA (Benomyl Streptomycin Malt Agar) حاوی عصاره مالت (۲٪)، آگار (۱۶ گرم در لیتر) ، قارچ‌کش بنومیل (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) کشت داده شد (Worrall, 1991).

برای رنگ‌آمیزی ریشه‌ها و اندازه‌گیری میزان کلنیزاسیون *Glomus intraradices* از روش Kormanik و Mc Graw (۱۹۸۲) استفاده شد (Kormanik & Mc Graw, 1982).

برای ارزیابی میزان کلنیزاسیون قارچ‌ریشه، از روش Slide method استفاده شد، که در آن ۹۰ قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌ها بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری، درصدی از طول ریشه‌ها که اندام قارچ ریشه در آن‌ها باشند، محاسبه گردید (Emami, 1996).

استخراج پروتئین با استفاده از روش Garmendia و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد (Garmendia *et al.*, 2004). دراین روش یک گرم از بافت ریشه‌ها داخل هاون چینی و با استفاده از ازت مایع کوبیده شده و سپس سه میلی‌لیتر بافر MacIlavain (Citric acid/Na2HPO4) ۱۰۰ میلی مولار (pH=۶/۸) حاوی هشت درصد (وزنی/حجمی) PVP (Polyvinylpyrrolidone)، یک میلی مولار DTT (Dithiothreitol)، یک میلی مولار از PMSF

(Phenylmethylsulfonyl fluoride) و ۰/۱ درصد از تریتون (Triton X–100) X–100 روی نمونه‌ها ریخته شد و خرد کردن بافت ریشه انجام و مخلوط نسبتاً همگنی به دست آمد. سپس با سانتریفیوژ مخلوط، فاز رویی جدا شد و پس از تعیین غلظت پروتئین، میزان فعالیت آنزیم‌ها مورد بررسی قرارگرفت. سنجش کمی پروتئین‌ها در عصاره به روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۵ نانومتر، میزان جذب نوری در هر نمونه اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

فعالیت کیتیناز با اندازه‌گیری میزان تولید اِن‌استیل‌بتادی گلوکزآمین (N–Acetyl–β–D–glucosamine) حاصل از کیتین و استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Jung *et al.*, 2005). در این روش محلول پروتئین استخراج شده با کیتین کلوئیدی یک درصد در بافر سدیم استات ۰/۱ مولار به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از آن با افزودن NaOH یک‌نرمال و سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی با یک میلی‌لیتر از معرف Schales (۰/۵ مولار کربنات سدیم (Merck) + ۱/۵ میلی‌مولار پتاسیم فریک سیانید (Ferric cyanide)) مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت و بلافاصله میزان جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با تهیه غلظت‌های مشخصی از اِن‌استیل‌بتادی‌گلوکزآمین در آب مقطر و رسم منحنی استاندارد، غلظت اِن‌استیل‌بتادی‌گلوکزآمین در نمونه‌ها محاسبه گردید. یک واحد فعالیت کیتیناز معادل مقدار آنزیمی است که می‌تواند یک میکرومول اِن‌استیل‌بتادی گلوکزآمین را در یک ساعت آزاد نماید (Jung *et al.*, 2005).

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که پایه پسته و تیمار مایکورایز تأثیر معنی‌داری روی بروز برخی صفات داشت. تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق شامل شاهد، مایه‌زنی با قارچ مایکورایزی، مایه‌زنی با *Armillaria*، برهمکنش قارچ مایکورایزی و *Armillaria* در *P. vera* بود. از این رو با نام‌گذاری، پارامترهای رویشی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

جدول ۱–تیمارهای آزمایش

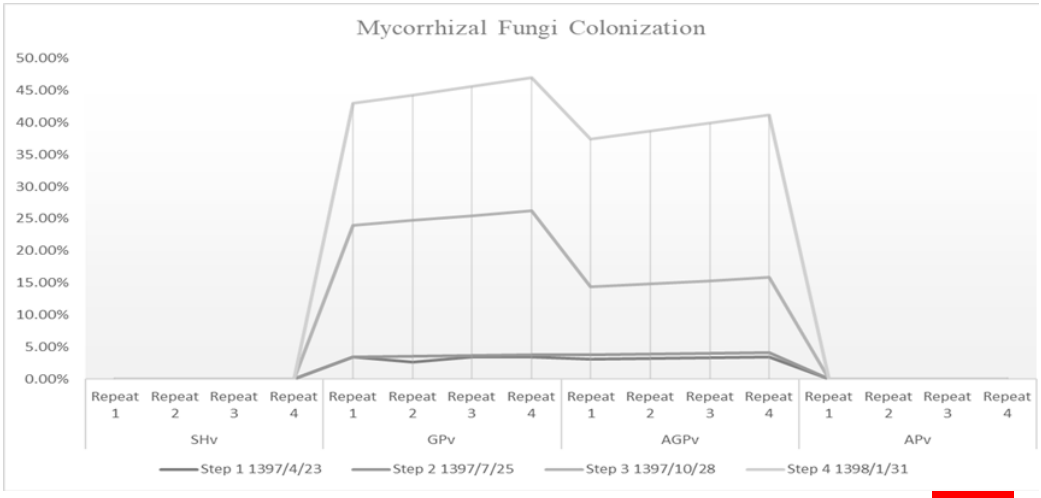
Table 1. Experimental treatments

Abbreviation	Treatment	No.
AGPv	*A.mellea* + *G. intraradices* + *P. vera*	**1**
APv	A.mellea + *P. vera*	**2**
GPv	*G. intraradices* + *P. vera*	**3**
SHv	*P. vera*	**4**

فعالیت بیمارگر در تیمارهای با حضور *A. mellea*، تعیین شد و قسمت‌های تحتانی ساقه از لحاظ تشکیل صفحات میسلیومی مورد بررسی قرار گرفت. در گروه AGPV کلنیزاسیون نسبت به گروه APV، ۴۷ درصد کاهش نشان داد، که می‌تواند حضور موثر قارچ مایکورایز و رقابت با قارچ عامل بیماری را نشان دهد. نتایج بدست آمده مبین کلنیزاسیون ریشه در تیمارهای گروه GPv و AGPv بود و نتایج یکسانی را با تحقیقات Koch *et al.* (2017)، نشان داد (شکل–۲). میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارهای گروه AGPv که در حضور *A. mellea* و *G. intraradices* قرار

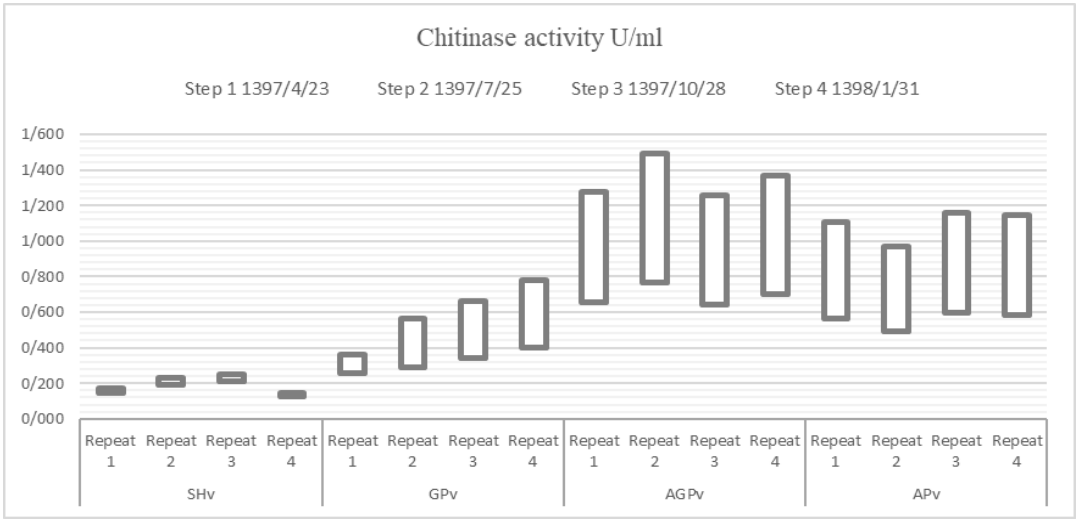
گرفتند، بیشترین مقادیر را در برداشت تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۸ نشان دادند. به‌طوری‌که در چهارمین تاریخ برداشت و تکرار دوم، مقدار ۱/۴۹۴ واحد بر میلی‌لیتر بالاترین میزان فعالیت کیتیناز نسبت به شاهد تعیین گردید. کمترین میزان فعالیت به تیمارهای گروه SHv یا شاهد به مقدار ۰/۱۲۳ تا ۰/۲۵۰ واحد بر میلی‌لیتر ثبت شد. فعالیت آنزیم کیتیناز تیمارهای گروه APv، با فعالیت آنزیمی ۰/۴۹۵ واحد بر میلی‌لیتر در تکرار دوم و برداشت تاریخ ۱۳۹۷/۴/۲۳ و ۱/۱۶۰ واحد بر میلی‌لیتر در تکرار سوم و برداشت چهارم مورخ ۱۳۹۸/۱/۳۱، پس از تیمارهای گروه AGPv نسبت به شاهد قرار گرفتند. مقادیر بدست آمده از فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارهای گروه GPv فاصله کمتری را با گروه SHv یا شاهد نشان دادند بطوریکه بیشترین میزان فعالیت ۰/۷۸۱ واحد بر میلی‌لیتر مربوط به برداشت چهارم در تاریخ ۱۳۹۸/۱/۳۱ ثبت گردید (شکل ۳).

امروزه گونه‌های مختلف *Glomus* spp. تقریباً در هر خاکی و به خصوص در میکروفلور ریزوسفر یافت می‌شوند. فسفر خاک می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در افزایش میزان کلنیزاسیون قارچ های AM در ریشه گیاهان باشد. توانایی گونه‌های *Glomus* در کاهش شیوع بیماری‌های خاکزاد و همچنین تحریک رشد گیاه باعث شده است که اعضای این جنس به عنوان عوامل بالقوه کنترل زیستی در نظر گرفته شوند (Akhtar & Siddiqui, 2010; Bleach *et al*., 2008; Calvet *et al*., 1993). علاوه بر این برخی مطالعات نیز نشان می‌دهد که قسمت‌های هوایی گیاهان مایکورایزی به بیمارگرهای برگی اجباری و غیر اجباری حساس‌تر می‌شوند (Dehne, 1982). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، در کلیه مراحل اندازه‌گیری، میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان دارای مایکوریز بیشتر از گیاهان شاهد بود. این آنزیم از خانواده آنزیم‌های قدرتمند در هم شکننده پیوندهای گلایکوسیدی در کیتین می‌باشد که در گیاهان به وفور همراه با مقاومت سیستمی (SAR) یافت می‌شود. بیان آن توسط ژن‌های NPR1 مسیر سالسیلیک اسید در مقاومت به قارچ‌ها و حشرات صورت می‌گیرد. برخی از گیاهان نیز برای تولید آن نیاز به همزیستی با قارچ‌ها دارند (Salzer *et al*., 2000). همچنین *A. mellea* به واسطه تولید میسلیوم فراوان و ایجاد آلودگی و از آنجایی‌که کیتین بخش لاینفک تشکیل‌دهنده میسلیوم آن است در برابر این آنزیم بسیار ضربه‌پذیر می‌باشد.



شکل ۲– مقایسه درصد کلنیزاسیون *G. intraradices* با ریشه تیمارهای آزمایش در تاریخ های برداشت شده.

Figure 2. Comparison of *G. intraradices* colonization percent with experimental treatments root at harvested dates.



شکل ۳– نمودار فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارها و زمان‌های برداشت شده

Figure 3. The chart of chitinase activity in treatments and harvested times

جدول ۲– تجزیه واریانس و بررسی تغییرات فعالیت شاخص آنزیم کیتیناز (Um/l) در تیمارهای آزمایش.

Table 2. Analysis of variance and evaluation of changes in chitinase activity (Um/l) in experimental treatme

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.287a	2	3.143	90.295	0.000
Intercept	23.771	1	23.771	682.830	0.000
AGPv	0.829	1	0.829	23.801	0.001
APv	5.458	1	5.458	156.788	0.952
GPv	0.700	1	0.699		0.011
SHv	6.687	1	0.000		0.998
Error	2.124	61	0.035		
Total	32.181	64			
Corrected Total	8.410	63			

مقادیر سیگما کوچک تر از پنج درصد نشان‌دهنده معنی‌دار بودن منابع در همان سطح و مقادیر بیشتر از پنج درصد حاکی از اختلاف خواهد بود.

Sigma values less than 0.05 indicate the significance of resources at the same level and values greater than 0.05 indicate a difference.

با این حال میانگین فعالیت آنزیم کیتیناز در مراحل مختلف اندازه‌گیری در گیاهان تلقیح نشده با قارچ (شاهد) تفاوت معنی‌داری باهم نشان ندادند. در این تحقیق می‌توان بیشترین فعالیت آنزیم کیتیناز را در گروه AGPv با حضور *G. intraradices* و *A. mellea* نشان داد که تفاوت معنی‌داری با شاهد در چهار مرحله داشتند. نتایج حاصله حاکی از آن است که در حضور قارچ‌های *G. intraradices* و *A. mellea*، تفاوت‌ها بیشتر از تلقیح هر یک از قارچ‌ها به تنهایی بود. نتیجه آزمایش نشان داد، فعالیت آنزیم کیتیناز در گروه APv (گیاه در تعامل با قارچ *A. mellea*) بیشتر از گروه GPv (گیاه در تعامل با *G. intraradices*) بود (جدول–۲).

این نشان از تحریک و سرعت بیان ژن‌ها در برابر عوامل بیمارگری مانند پوسیدگی آرمیلاریایی دارد. با وجود

تحقیقات مشابه Garmendia و همکاران (۲۰۰۴)، انتظار می‌رفت فعالیت آنزیم کیتیناز ریشه گیاه در عدم حضور قارچ مایکوریز در تعامل با *A.mellea* پایین‌تر از میانگین فعالیت آنزیم در گیاهان مایه‌زنی شده با *G.intraradices* باشد (Garmendia *et al*., 2004). حال اینکه در این تحقیق تفاوت معنی‌داری بین دو گروه GPv و APv مشاهده شد که در تجزیه و تحلیل ریشه در حضور عامل بیماری پوسیدگی ریشه، با تحقیقات Onsando & Waudo (1994)، نتایج مشابهی را نشان داد. در این مطالعه قارچ عامل بیماری به تنهایی توانست افزایش تولید کیتیناز در گیاه را تحریک کند. از آنجایی‌که دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها از واحدهایی بنام اناستیل‌گلوکزآمین تشکیل شده و قارچ عامل *A.mellea* نیز از این قاعده مستثنی نیست، پس از ورود به گیاه با انتشار سیگنال‌های مختص خود، بیان سریع دسته‌های ژنی را تحریک و افزایش داد. در این تحقیق مشخص شد پایه پسته (*P.vera*) می‌تواند در برابر قارچ، غلظت آنزیم کیتیناز را در گروه AGPv با سرعت نسبتا سریع (چهار تا هفت روز پس از تلقیح) افزایش دهد که با تحقیقات Garmendia *et al*. (2004) نتایج یکسانی را نشان داد. در نمونه‌های برداشت‌شده بعدی نیز غلظت آنزیم کیتیناز همچنان رو به افزایش بود. به‌طوری که در تکرارهای برداشت اول و میانگین تکرارهای برداشت آخر، اختلاف معنی‌داری در غلظت این آنزیم مشاهده شد. حساسیت قارچ *A. mellea* به کیتیناز می‌تواند همواره عامل اصلی بازدارندگی کاهش محصول پسته باشد. به هر حال بیماری پوسیدگی آرمیلاریایی ریشه در پسته خسارت گسترده‌ای بصورت اپیدمیک ایجاد نمی‌نماید، ولی با داشتن رایزومورف اختصاصی و طویل در خاک، مقاومت بسیار بالایی در برابر کنترل شیمیایی و فیزیکی نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که در پایه پسته، قارچ همزیست *G.intraradices* می‌تواند به عنوان عامل بازدارنده در برابر قارچ *A.mellea* به صورت بیوشیمیایی و زیستی عمل نماید. بطوری‌که با حضور مایکورایز پیش از وقوع بیماری، کیتیناز در غلظت‌های بالا تولید و آمادگی رویارویی گیاه با قارچ عامل بیماری بیشتر می‌شود، تا جایی‌که با کاهش رایزومورف و انتشار بیماری، خسارت *A. mellea* کاهش و در نتیجه موجب از بین نرفتن محصول در مقادیر بالا خواهد شد.

References

Amirahmadi, A., Khabaz, H.V. & Asef, M.R. 2006. The first report of *Armillaria mellea* on pistachios, pomegranates, figs and apricots from Iran, published by the Iranian Plant Protection Congress, 29–22.

Azcón–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.

Barea, J.M. & Jeffries, P. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil–plant systems. In Mycorrhiza Springer Berlin Heidelberg, 521–560.

Baumgartner, K. & Rizzo, D.M. 2006. Relative resistance of grapevine root stocks to *Armillaria* root disease. American Journal of Enology and Viticulture, 57: 408–414.

Bleach, C.M., Cope, R.J., Jones, E.E., Ridgway, H.J. & Jasper, M.V. 2008. Impact of mycorrhizal colonization on grapevine establishment in *Cylindrocarpon* infested soil, New Zealand Plant Protection, 61: 311–316

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248–254.

Calvet, C., Pera, J. & Barea, J.M. 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta L.*) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat–perlite mixture. Journal of Plant and Soil, 148: 1–6.

Campbell, R. 1989. Biological Control of Microbial Plant Pathogens. Cambridge University Press. pp.

Dehne, H.W. 1982. Interaction between vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology, 72: 1115–1119.

Emami, A. 1996. Plant Decomposition Methods, Soil and Water Research Institute Publications, Technical Journal, 982: 132–128.

Esmailpour, A., Emami, S.Y., Basirat, M., Panahi, B., Tajabadipour, A., Javanshah, A.A., Hosseinifard, S.J., Haghdel, M., Shaker Ardakani, A., Sedaghati, N., Eshghi, N., Anghaei, M., Mohseni, A., Mohammadi, A.H. & Hashemirad, H. 2015. Pistachio manual (planting, harvest). 1st, Publisher: Agricultural Education Publication. 307 pp.

Garett, S.D. 1960. Rhizomorph behavior in *Armillaria mellea* (Fr.) Quel. III Saprophytic colonization of woody substrates in soil. Annals of Botany, 24: 275–285.

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

Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J. & Javed, S. 2013. Chitinases: an update. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 5: 21–29.

Haran, S., Schickler, H. & Chet, I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142: 2321–2331.

Jung, W.J., Jin, Y.L., Kim, K.Y., Park, R.D. & Kim, T.H. 2005. Changes in pathogenesis–related proteins in pepper plants with regard to biological control of *Phytophthora* blight with *Paenibacillus illinoisensis*. Biocontrol, 50: 165–178.

Kawano, T., 2003. Roles of the reactive oxygen species–generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reports, 21: 829–837.

Kile, G.A. 1980. Behaviour of *Armillaria* in some *Eucalyptus obliqua–Eucalyptus* regnans forests in Tasmania and its role in their decline. Forest Pathology, 10: 278–296.

Koch, R.A., Wilson, A.W., Séné, O., Henkel, T.W. & Aime, M.C. 2017. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, Guyanagaster. BMC Eevolutionary Biology, 17: 33–34

Kormanik, P.P. & Mc Graw, A. 1982. Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. pp: 37–45 In: Methods and principles of mycorrhizal research. N.C. Schenk. APS Press, St. PaulMinnesota, USA. 244pp.

Kubiak, K., Żółciak, A., Damszel, M., Lech, P. & Sierota, Z. 2017. *Armillaria* pathogenesis under climate changes. Forests, 8: 100–112.

Meddad–Hamza, A., Beddiar, A., Gollotte, A., Lemoine, M.C., Kuszala, C. & Gianinazzi, S. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. African Journal of Biotechnology, 9: 1159–1167.

Mohammadi, A. & Haghdel, M. 2016. Identification of Dominant *Trichoderma* Species in Pistachio Orchards of Kerman Province. Journal of Plant Protection, 30: 82–92.

Morrison, D.J. 2004. Rhizomorph growth, habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species. Forest Pathology, 34: 15–26.

Onsando, J.M. & Waudo, S.W. 1994. Interaction between *Trichoderma* species and *Armillaria* root rot fungus of tea in Kenya. International Journal of Pest Management, 11: 69–74.

Pearce, M.H. & Malajczuk, N. 1990. Inoculation of *Eucalyptus diversicolor* thinning stumps with wood decay fungi for control of *Armillaria luteobubalina*. Plant and Soil, 22: 347–350.

Peterson, R.L., Massicotte, H.B. & Melville, L. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press.

Pitson, S.M., Seviour, R.J., & McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal β–glucanases: their physiology and regulation. Enzyme Microbiology and Technology, 15: 178–192.

Raabe, R.D. & Trujillo, E.E. 1963. *Armillaria mellea* in Hawaii. Plant Disease Reporter, 47: 776–777.

Razique, F. & Fox, R.T.V. 2004. Antagonistic activities of selected fungal isolates against *Armillaria mellea*. Biological Agriculture and Horticulture, 22: 41–56.

Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vögeli–Lange, R., Aeschbacher, R.A, Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R. & Boller, T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Molecular Plant–Microbe Interactions, 13: 763–77.

Smith, S.E. & Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3nd ed. Academic Press, 53–60.

Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. European Journal of Plant Pathology, 103: 753–765.

Worrall J.J. 1991. Media for selective isolation of *Hymenomycetes*. Mycologia, 12: 296–302.

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. 1999. Induction of defense reponses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1061–1070.

The effect of *Glomus intraradices* on chitinase enzyme production in pistachios inoculated with *Armillaria mellea*

Hesam aldin Hassani[1], Mohammad Salari[2], Mehdi Pirnia[3], Amir Hossin Mohammdi[4]

1, 2, 3. PhD student, Associate Professor, Associate Professor, Faculty of Agriculture, Department of Plant Pathology, University of Zabol, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran.
Corresponding author: Mohammad Salari, email: salari21m@yahoo.com

Received: Jul., 6, 2021 9(1) 25–33 Accepted: Jan., 25, 2022

Abstract

Pistachio is an important and economical crop that is attacked by *Armillaria mellea* and causes a significant reduction in yield and deterioration. Root rot disease caused by *Armillaria mellea* is one of the fungal diseases which has been increasing in pistachio orchards in recent years. Extensive mechanisms and complex life cycle limit its control and almost impossible. In this study, the biochemical aspects of *Glomus intraradices* and *A. mellea* root symbiotic interaction on *Pistachio vera* root, Badami zarand cultivar, as a sensitive rootstock were investigated. This experiment was performed in a completely randomized design and factorial with four replications in greenhouse conditions. Chitinase activity enzyme was calculated based on the amount of N–acetyl glucose amine released. The results showed that colonization with symbiotic fungi changed enzymatic activities in favor of the plant, which was directly related to the percentage of colonization of symbiotic fungi with roots. The results showed an increase and maximization of chitinase activity enzyme in the roots of plants inoculated with mycorrhizal fungi.

Keywords: Soil–borne disease, Arbuscular mycorrhizal fungi, biocontrol