

## مقاله تحقیقی

تأثیر *Glomus intraradices* بر میزان تولید آنزیم کیتیناز در پسته تلقیح شده با *Armillaria mellea*حسام‌الدین حسنی<sup>۱</sup>، محمد سالاری<sup>۱</sup>، مهدی پیرنیا<sup>۱</sup>، امیرحسین محمدی<sup>۲</sup>

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

۳۳-۲۵(۱)۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۵

## 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 *A. mellea* ایجاد می‌شود. مکانیزم‌های گسترده و چرخه زندگی پیچیده قارچ، کنترل آن را محدود و تقریباً 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 زرنده به عنوان پایه‌ی حساس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل با چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. فعالیت آنزیم کیتیناز بر اساس میزان آن 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 میکوریز بود.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری‌های خاکزاد، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، کنترل زیستی

## مقدمه

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 به عنوان 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 به صورت اپیفیتی (Epiphytic) روی سیستم ریشه گیاهان میزبان مرده، بیمار یا سالم رشد می‌کند

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 گونه گیاهی می‌باشند، نقش مهمی به عنوان یک میکروارگانیسم تجزیه‌کننده در محیط

*Glomeromycota* بوده و قادر به ايجاد رابطه همزیستی و ارتباط دو طرفه‌ای میان آن‌ها با ریشه بیش از ۹۰ درصد گیاهان بازدانه، نهان‌دانه، سرخس‌ها و خزها می‌باشد (Smith & Read, 2008). در اکوسیستم‌های طبیعی، بیشتر سیستم‌های ریشه‌ای می‌توانند با قارچ‌های میکوریزی همزیست شوند (Peterson et al., 2004). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM=Arbuscular Mycorrhizae) تقریباً در همه خاک‌ها و مناطق گرمسیری، معتدل، سردسیری و نیز در بیشتر خاک‌های زراعی وجود دارند (Smith & Read, 2008). ارتباط دو سویه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و گیاهان می‌تواند باعث افزایش سلامت گیاهان، سلامت خاک، کمک به چرخه کربن و غلبه بر تنش‌های زنده و غیر زنده شود (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

### مواد و روش‌ها

#### آزمایش تاثیر قارچ *Glomus intraradices* بر تولید

##### آنزیم کیتیناز 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 خسیانیدن بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر سترون و ضدعفونی با قارچ‌کش‌های بنومیل و PCNB (Pentachloronitrobenzene) (به میزان دو در هزار از هر کدام قارچ‌کش‌ها)، در پارچه ملامل و ظروف پلاستیکی درب‌دار سترون و در دمای اتاق نگهداری شد. حدود ۱۰ روز بعد بذرهاى 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 سانتی متری حاوی قطعه تکنیری *Glomus intraradices* (تهیه شده از شرکت زیست فناوران توران، به تایید دانشگاه شیراز دانشکده کشاورزی) در خاک ریخته شد تا پس از رشد ریشه نهال و تماس با مایه قارچ

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

از آنجایی که 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 ايجاد کرد. بررسی‌های متعدد نشان داد که احتمال موفقیت در کنترل این بیماری با استفاده از میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست به تنهایی یا به همراه سایر روش‌های کنترلی بسیار بیشتر می‌باشد (Pearce & Malajczuk, 1990; Waudou, 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. ریزومورف‌های 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 میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست به تنهایی یا به همراه سایر روش‌های کنترلی بسیار بیشتر می‌باشد (Pearce & Malajczuk, 1990; Waudou, 1994; Onsando Razique & Fox, 2004). یکی از معروف‌ترین و رایج‌ترین میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست، قارچ‌های میکورایزای آربوسکولار می‌باشند، که جزء شاخه

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.

به منظور تعیین میزان فعالیت بیمارگر، میزان مرگ و میر نهال‌ها در هر تیمار محاسبه شد. قسمت‌های پایینی ساقه نهال‌ها نیز از نظر تشکیل صفحات میسلومی 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)، قارچ کش بنومیل (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم 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). در این روش یک گرم از بافت ریشه‌ها داخل هاون چینی و با استفاده از ازت مایع کوبیده شده و سپس سه میلی‌لیتر بافر MacIlvain (Citric acid/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ۱۰۰ میلی مولار PVP (pH=۶/۸) حاوی هشت درصد (وزنی/حجمی) DTT (Polyvinylpyrrolidone)، یک میلی مولار

مایکوریزی، 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 در میان 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 مایکوریزی کلنیزه شد، استفاده شد. قبل از مایه‌زنی با تیغ اسکالپل، قسمت قاعده 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 کاملاً 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

سيانيد (Ferric cyanide)) مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقيقه در آب جوش قرار گرفت و بلافاصله ميزان جذب نوري در ۴۲۰ نانومتر اندازه گيري شد. با تهيه غلظت‌هاي مشخصي از اين استيل‌بتادي گلوکزآمين در آب مقطر و رسم منحنى استاندارد، غلظت اين استيل‌بتادي گلوکزآمين در نمونه‌ها محاسبه گرديد. يك واحد فعاليت كيتيناز معادل مقدار آنزيمي است كه مي‌تواند يك ميكرومول اين استيل‌بتادي گلوکزآمين را در يك ساعت آزاد نمايد (Jung et al., 2005).

### نتايج و بحث

نتايج بدست آمده نشان داد كه پايه پسته و تيمار مايكوريژ تاثير معني‌داري روي بروز برخي صفات داشت. تيمارهاي مورد استفاده در اين تحقيق شامل شاهد، ميه‌زني با قارچ مايكوريژي، ميه‌زني با *Armillaria*، برهم‌كنش قارچ مايكوريژي و *Armillaria* در *P. vera* بود. از اين رو با نام گذاري، پارامترهاي رويشي مورد بررسي و مقايسه قرار گرفت.

(Dithiothreitol)، يك ميلي مولار از PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) و ۰/۱ درصد از تريتون (Triton X-100) X-100 روي نمونه‌ها ريخته شد و خرد كردن بافت ريشه انجام و مخلوط نسبتاً همگني به دست آمد. سپس با سانترفيوژ مخلوط، فاز رويي جدا شد و پس از تعيين غلظت پروتئين، ميزان فعاليت آنزيم‌ها مورد بررسي قرار گرفت. سنجش كمى پروتئين‌ها در عصاره به روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. در نهايت با استفاده از دستگاه اسپكتروفوتومتر در طول موج ۵۸۵ نانومتر، ميزان جذب نوري در هر نمونه اندازه گيري شد (Bradford, 1976).

فعاليت كيتيناز با اندازه گيري ميزان توليد اين استيل‌بتادي گلوکزآمين (N-Acetyl-D-glucosamine) حاصل از كيتين و استفاده از دستگاه اسپكتروفوتومتر اندازه گيري شد (Jung et al., 2005). در اين روش محلول پروتئين استخراج شده با كيتين كلوئيدى يك درصد در بافر سدويم استات ۰/۱ مولار به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سلسيوس نگهداري شد و پس از آن با افزودن NaOH يك‌نرمال و سانترفيوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۱۰ دقيقه، محلول رويي با يك ميلي‌ليتر از معرف Schales (۰/۵ مولار كربنات سدويم (Merck) + ۱/۵ ميلي‌مولار پتاسيم فريك

جدول ۱- تيمارهاي آزمايش

Table 1. Experimental treatments

Abbreviation	Treatment
AGPv	<i>A.mellea</i> + <i>G. intraradices</i> + <i>P. vera</i>
APv	<i>A.mellea</i> + <i>P. vera</i>
GPv	<i>G. intraradices</i> + <i>P. vera</i>
SHv	<i>P. vera</i>

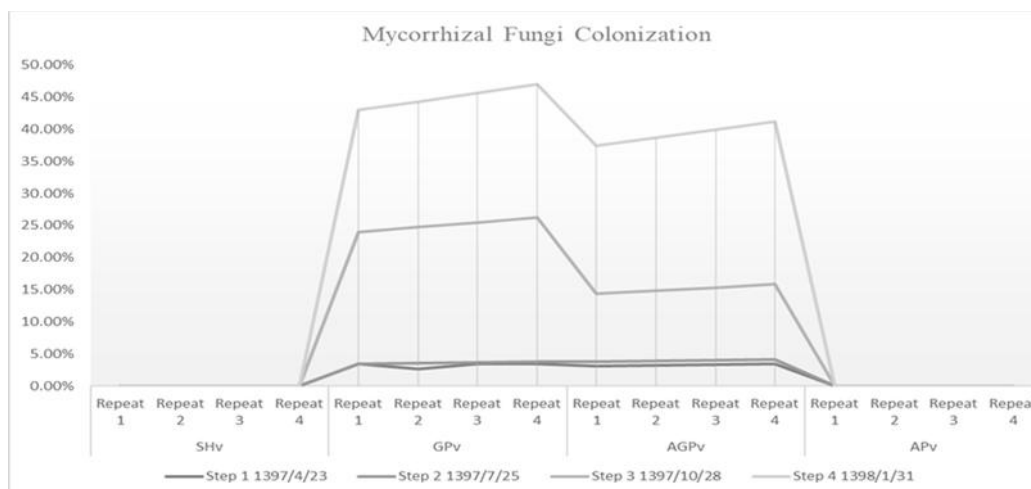
نشان داد، كه مي‌تواند حضور موثر قارچ مايكوريژ و رقابت با قارچ عامل بيماري را نشان دهد. نتايج بدست آمده مابين كلنيزاسيون ريشه در تيمارهاي گروه GPv و AGPv بود و نتايج يكساني را با تحقيقات (Koch et al., 2017)، نشان داد

فعاليت بيمارگر در تيمارهاي با حضور *A. mellea* تعيين شد و قسمت‌هاي تحتاني ساقه از لحاظ تشكيل صفحات ميسليومي مورد بررسي قرار گرفت. در گروه AGPv كلنيزاسيون نسبت به گروه APv، ۴۷ درصد کاهش

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 میکوریزی به بیمارگرهای برگ‌ی اجباری و غیر اجباری حساس تر می‌شوند (Dehne, 1982). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، در کلیه مراحل اندازه‌گیری، میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان دارای میکوریز 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 سالیسیلیک 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 میسلیم فراوان و ایجاد آلودگی و از آنجایی که کیتین بخش لاینفک تشکیل‌دهنده میسلیم آن است در برابر این آنزیم بسیار ضربه‌پذیر می‌باشد.

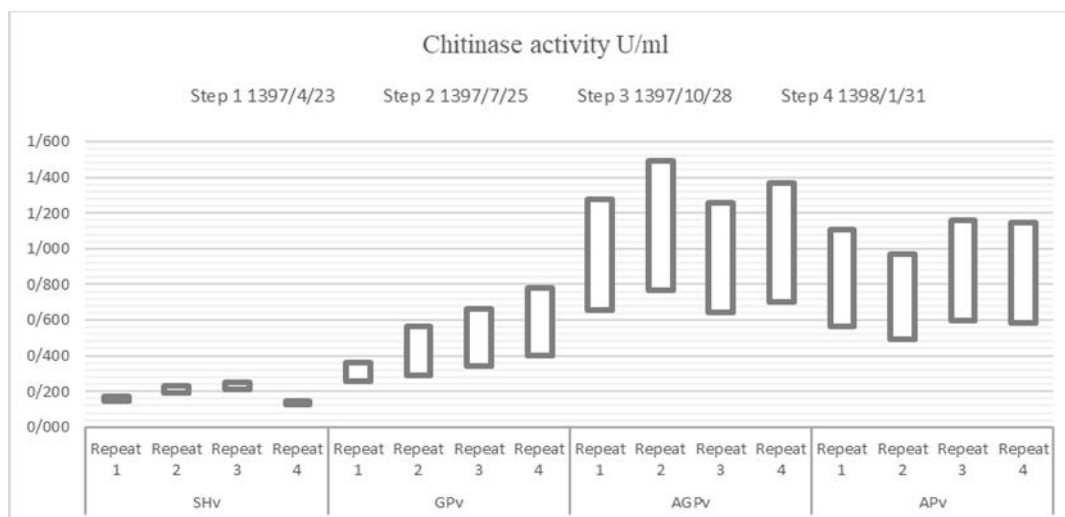
(شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارهای گروه AGPv که در حضور *A. mellea* و *G. intraradices* قرار گرفتند، بیشترین مقادیر را در برداشت تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۸ نشان دادند. به طوری که در چهارمین تاریخ برداشت و تکرار دوم، مقدار ۱/۴۹۴ واحد بر میلی‌لیتر بالاترین میزان فعالیت کیتیناز نسبت به شاهد تعیین گردید. 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 ۲).

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 قارچ‌های AM در ریشه گیاهان باشد. توانایی



شکل ۱- مقایسه درصد کلنیزاسیون *G. intraradices* با ریشه تیمارهای آزمایش در تاریخ‌های برداشت شده

Figure 1. Comparison of *G. intraradices* colonization percent with experimental treatments root at harvested dates



شکل ۲- فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارها و زمان‌های برداشت شده

Figure 2. The 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 treatments

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.

G. حاکی از آن است که در حضور قارچ‌های *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).

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 *A. mellea* و *G. intraradices* نشان داد که تفاوت معنی‌داری با شاهد در چهار مرحله داشتند. نتایج حاصله

Garmendia *et al.* (2004) نتایج یکسانی را نشان داد. در نمونه‌های برداشت‌شده بعدی نیز غلظت آنزیم کیتیناز همچنان رو به افزایش بود. به طوری 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 ریزومورف 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. بطوری که با حضور مایکوریز پیش از وقوع بیماری، کیتیناز در غلظت‌های بالا تولید و آمادگی رویارویی گیاه با قارچ عامل بیماری بیشتر می‌شود، تا جایی که با کاهش ریزومورف 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.
- 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.

این نشان از تحریک و سرعت بیان ژن‌ها در برابر عوامل بیماری‌گری 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 مابه‌زنی 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 & Waudو (1994)، نتایج مشابهی را نشان داد. در این مطالعه قارچ عامل بیماری به تنهایی توانست افزایش تولید کیتیناز در گیاه را تحریک کند. از آنجایی که 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 دسته-های 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 نسبتاً سریع (چهار تا هفت روز پس از تلقیح) افزایش دهد که با تحقیقات

- 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 Evolutionary 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. Paul, Minnesota, USA. 244pp.
- Kubiak, K., óciak, 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. & Waudu, 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 –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*, 3rd 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 *Hymenomyces*. *Mycologia*, 12: 296–302.
- Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. 1999. Induction of defense responses 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*

Hesameddin Hassani<sup>1</sup>, Mohammad Salari<sup>1</sup>, Mehdi Pirnia<sup>1</sup>, Amir Hossein Mohammadi<sup>2</sup>

1. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran

2. Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran

Corresponding author: Mohammad Salari, email: salari21m@yahoo.com

---

Received: July, 6, 2021

9(1) 25–33

Accepted: Jan., 25, 2022

---

### Abstract

Pistachio is an important and economical crop that is attacked by *Armillaria mellea* which causes a significant reduction in yield and deterioration. Root rot disease caused by *A. 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:** Soilborne disease, arbuscular mycorrhizal fungi, biocontrol