نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 356-349

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 349-356

بررسی تغییرات آنزیم کیتیناز در برهمکنش قارچ میکوریز آربوسکولار (*Glomus mosseae*) و نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) در گوجه‌فرنگی

فاطمه سهرابی[1*]- علی اکبر فدایی تهرانی[2]- یونس رضایی دانش[3]

تاریخ دریافت: 1392/11/12
تاریخ پذیرش: 1394/03/25

چکیده

تحقیقات متعدد بیانگر نقش مثبت قارچ‌های میکوریز در کاهش خسارت عوامل بیماری‌زای گیاهی از طرق مختلف بوده است. افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان میکوریزی، یکی از مکانیسم‌های درگیر مورد اشاره در کنترل بیمارگرهای گیاهی توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌باشد. به منظور بررسی دخالت مکانیسم مذکور در برهمکنش قارچ میکوریز و نماتد ریشه‌گرهی در گوجه‌فرنگی، از قارچ میکوریز *Glomusmosseae* و نماتد *Meloidogynejavanica* استفاده شد. ابتدا میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان شاهد (بدون میکوریز) با گیاهان میکوریزی در چهار مرحله متوالی (هفتگی) مقایسه گردید. سپس مایه‌زنی گوجه‌فرنگی با قارچ میکوریز آربوسکولار و نماتد به تنهایی، و در ترکیب با هم و گیاهان بدون مایه زنی با قارچ و نماتد (شاهد) به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه انجام شد و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در ریشه طی چهار مرحله با فواصل 48 ساعته پس از انجام مایه‌زنی با نماتد، صورت گرفت.میزان فعالیت آنزیم کیتیناز هر نمونه گیاهی به طریق رنگ سنجی و براساس میزان ان استیل گلوکز آمین آزاد شده محاسبه شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده بالاتر بودن فعالیت آنزیمکیتیناز در گیاهان میکوریزی نسبت به شاهد بود که دو هفته بعد از تلقیح به حداکثر میزان خود رسید. هم‌چنین حداکثر فعالیت آنزیم در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و نماتد ریشه‌گرهی، در روز چهارمبعد از مایه‌زنی نماتد مشاهده گردید. در مجموع نتایج نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی بود و حمله نماتد در حضور قارچ میکوریز افزایش بیشتری در فعالیت کیتیناز ایجاد کرد.

واژه‌های کلیدی: *Glomus mosseae*، *Meloidogyne javanica*، آنزیم کیتیناز، گوجه‌فرنگی

مقدمه

نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* یکی از مهم‌ترین عوامل بیمارگر در بسیاری از محصولات از جمله گوجه-فرنگی می‌باشد (10). افزایش روزافزون تقاضای مصرف گوجه‌فرنگی موجب گسترش سطح زیر کشت آن در شرایط مزرعه و گلخانه و جلب سرمایه‌گذاری وسیع در تولید آن شده است (38). روش‌های مختلفی در مدیریت نماتدهای ریشه‌گرهی استفاده می‌شود ولی هیچ یک روش قاطع و مؤثری برای مبارزه محسوب نمی‌شوند (50). یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر برای کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از ریز جانداران متنوعی است که نماتدهای ریشه‌گرهی را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش جمعیت آن‌ها می‌گردند. آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از کاربرد آفت‌کش‌ها در سال‌های اخیر موجب تقویت این ایده شده است (18). قارچ‌های میکوریز از جمله عواملی هستند که سبب کاهش تعدادی از بیماری‌های گیاهی شده و به طور مستقیم و یا غیرمستقیم می‌توانند روی جمعیت نماتد ریشه‌گرهی اثر بگذارند (4، 21 و 27).

مطالعه مکانیسم‌های درگیر در کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی توسط قارچ‌های میکوریز می‌تواند به استفاده عملی آن‌ها در کنترل بیمارگرهای مذکور کمک نماید. مطالعات انجام شده در این زمینه بسیار محدود می‌باشد. در تعدادی از این بررسی‌ها بخشی از کاهش خسارت نماتد در اثر حضور قارچ‌های میکوریز به افزایش رشد گیاه در اثر جذب عناصر معدنی به ویژه فسفر (30 و 44) و افزایش فتوسنتز (1) نسبت داده شده است. ولی سهم بزرگی از کاهش بیماری‌زایی نماتد روی گیاه می‌تواند ناشی از تحریک واکنش دفاعی گیاه توسط قارچ باشد. در تحقیقات انجام شده تاکنون نقش چندین ژن و فرآورده پروتئینی در واکنش دفاعی گیاهان در همزیستی‌های میکوریزی مشخص شده است (19). نقش ژن‌های مذکور در تولید

1 و 2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: Email: h.sohrabi2010@yahoo.com)
3- دانشیار بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

فیتوالکسین‌ها، بتا 1و3 گلوکاناز، کیتیناز و PR پروتئین‌ها به اثبات رسیده است (34). در مواردی نیز افزایش اسیدآمینه در گیاهان میکوریزی مشاهده شده است (41 و 43). بخش دیگریاز کاهش بیماری‌زایی نماتد می‌تواند ناشی از حفاظت مستقیم ریشه توسط میکوریز و یا رقابت برای اشغال محل‌های تغذیه و استقرار ریزجانداران فراریشه باشد (16 و 20). در مجموع افزایش مواد غذایی، تغییرات بیوشیمیایی در بافت‌های گیاهی، تغییرات آناتومیکی، تغییرات میکروبی در ریزوسفر و تغییرات مورفولوژیکی ریشه از مکانیسم‌های عمده‌ای است که به دخالت آن‌ها در روابط میکوریزی اشاره شده است (15). در بین تغییرات بیوشیمیایی نقش آنزیم‌های مختلف و بویژه کیتیناز در مهار زیستی تعدادی از بیمارگرهای گیاهی مورد توجه زیادی قرار گرفته است و در تحقیقات مختلف به افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌ها، شامل کیتیناز در گیاهان میکوریزی اشاره شده (25، 36 و 46) و در مواردی نقش آنزیم‌های مذکور در کنترل پاتوژن‌ها نشان داده شده است (53).

اهمیت کیتیناز ناشی از آن است که کیتین که پلیمری پلی‌ساکاریدی $(C_8H_{13}O_5N)_5$ مرکب از واحدهای ان- استیل گلوکز آمین است (12)، از نظر فراوانی اغلب به عنوان دومین پلی‌ساکارید موجود در طبیعت به شمار می‌رود (55) و ترکیب اصلی دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها، کوتیکول حشرات، پوشش تخم نماتدها و نیز اسکلت خارجی سخت پوستان، میگو و فلس ماهی (29 و 52) وجود دارد. بنابراین به عنوان یک هدف مناسب در مهار زیستیبیمارگرها مورد توجه قرار گرفته است (55). کیتیناز قادر است با شکستن پیوند گلیکوزیدی کیتین (پلی‌ساکارید نامحلول) را به الیگوساکاریدهای محلول و نامحلول با وزن مولکولی پایین‌تر تجزیه نماید (11). کیتینازها از نظر نحوه شکستنرشته‌های کیتین به دو گروه اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز تقسیم می‌شوند (8). علاوه بر گیاهان عالی تعدادی از ریزجانداران هم‌چون اکتینومیست‌ها، باکتری‌های خاک‌زی و قارچ‌های مختلف قادر به ترشح کیتیناز می‌باشند و در مواردی ظاهراً در کنترل بیولوژیکی بیمارگرها دخالت دارند. تولید کیتیناز در گیاهان به طور طبیعی و یا در اثر تحریک عوامل مختلف از جمله قارچ‌های میکوریز صورت می‌گیرد. یکی از نقش‌های احتمالی کیتینازها، دخالت آن‌ها در مکانیسم دفاعی گیاهان عالی در برابر حمله بیمارگرها است (54). به نحوی که یکی از مکانیسم‌های درگیر در کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان میکوریزی ذکر شده است (2، 24 و 31).

با بررسی‌های انجام شده توسط اسپانو و والپین مشخص شد که در طی کلونیزاسیون یونجه با قارچ میکوریز *Glomus intraradices* و هم‌چنین کلونیزاسیون تره‌فرنگی با *Glomus mosseae* میزان فعالیت آنزیم کیتیناز افزایش می‌یابد (46 و 51). هم‌چنین دیوید و همکاران در طی تحقیقات صورت گرفته متوجه شدند که تلقیح تنباکو با قارچ میکوریز *Glomus intraradices* سبب افزایش آنزیم کیتیناز می‌گردد (13). پوزو و همکاران نیز در طی تحقیقاتی که انجام دادند متوجه شدند آنزیم کیتیناز در واکنش دفاعی گیاهان نقش دارد (35). هدف از این تحقیق بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با قارچ میکوریز و نقش آن در کنترل نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح نماتد *M. javanica*

به منظور تهیه مایه تلقیح نماتد، تعدادی نمونه خاک و ریشه از مزارع آلوده گوجه‌فرنگی استان چهار محال و بختیاری جمع‌آوری و در آزمایشگاه پس از شستشو، در زیر میکروسکوپ تشریح تک توده تخم‌های نماتد جدا و جهت تکثیر و تهیه جمعیت خالص نماتد، مجاورریشه نشاهای گوجه‌فرنگی دو تا چهار برگی رقم حساس روتگرزقرار داده شدند. نماتدهای ماده تولیدکننده توده‌های تخم مذکور با سوزن از گال‌ها خارج و جهت شناسایی از انتهای بدن آن‌ها برش عرضی تهیه گردید. نشاهای تلقیح شده جهت تکمیل حداقل دو نسل نماتد (60 روز) در شرایط مساعد گلخانه (دمای 25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. از انتهای بدن نماتدهای ماده بالغ مجدداً برش عرضی تهیه و الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن جهت شناسایی مورد بررسی قرار گرفت (49). از سایر مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی این ماده‌ها و نیز مشخصات مذکور در نوزادان سن دوم (J_2) برای تکمیل شناسایی استفاده گردید.

تهیه مایه تلقیح قارچ میکوریز*G.mosseae*

برای انجام این بررسی از قارچ میکوریز آربوسکولار (Nicol. &Gerd) Gerdemann&Trapp*Glo musmosseae* (اهدایی از دانشگاه ارومیه) استفاده گردید. جهت تهیه مایه تلقیح قارچمذکور از روش کشت گلدانی تله با استفاده از شبدر سفید (*Trifolium subterraneum*) به عنوان گیاه تله استفاده شد (39). به این ترتیب که ابتدا برای جوانه‌زنی، بذرهای شبدر پس از ضدعفونی باهیپوکلریت سدیم10 درصدتجاری در تشتک‌های سترون مرطوب قرار داده شدند. دو روز بعد از تندش، بذرهای مذکور به گلدان‌هایبا بستر ماسه سترون حاوی 15 درصد مایه تلقیح خالص قارچ میکوریزمنتقل و جهت تکثیربه مدت چهار ماه در شرایط مطلوب گلخانه(دمای 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی) نگهداری شدند. برای تأمین مواد غذایی گیاهان در مدت مذکور از محلول‌های غذایی مکمل (هوگلند) بدون فسفر استفاده شد (37). قبل از برداشت مایه تلقیح، به منظور ایجاد تنش برای تحریک قارچ به اسپورزایی بیشتر،

بخش‌های هوایی و سبز گیاهان قطع و گلدان‌ها به مدت یک ماه در شرایط خشک نگهداری شدند (28). به منظور اطمینان از خلوص قارچ‌ها و کلونیزه شدن ریشه‌ها، قطعات ریشه به‌طور تصادفی رنگ‌آمیزی (32) و جهت مشاهده اندام‌های مختلف قارچ (وزیکول، آربوسکول و اسپور) در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی اسپورها و برآورد تعداد آن‌ها، به روش شستشو با الک و سانتریفوژ با استفاده از محلول سوکروز 55 درصد صورت گرفت (23).

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز

ابتدابهمنظوربررسینقش قارچ میکوریز در تغییر فعالیت آنزیم کیتیناز در گوجه‌فرنگی اندازه‌گیری آنزیم مذکور در عصاره ریشه به مدت یک ماه (در فواصل یک هفته‌ای) در گیاهان تلقیح شده با قارچ و گیاهان شاهد (بدون قارچ) در سه تکرار انجام شد. میزان استیل گلوکز آمین آزاد شده بر حسب مقدار جذب نور در اسپکتروفومتر معیار ارزیابی فعالیت آنزیم کیتیناز قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت مدل خطی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل‌گردید.

در مرحله بعد جهت مطالعه فعالیت آنزیم کیتیناز در برهمکنش قارچ و نماتد ریشه‌گرهی روی گوجه‌فرنگی آزمایشی با چهار تیمار (شاهد بدون مایه‌زنی با قارچ میکوریز و نماتد، مایه‌زنی با قارچ میکوریز، مایه‌زنی با نماتد ریشه‌گرهی و مایه‌زنی با قارچ میکوریز و نماتد ریشه‌گرهی) و سه تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در چهار مرحله (در فواصل 48 ساعته) صورت گرفت. اندازه‌گیری فعالیت به روش قبل و بعد از کلونیزاسیون کامل ریشه توسط قارچ (یک ماه بعد از تلقیح) و دو روز بعد از مایه‌زنی با نماتد آغاز گردید. در نهایت داده‌های حاصل در زمان‌های مختلف به‌صورت مرکب تجزیه و تحلیل آماری شد. بذر گوجه‌فرنگی رقم فلات ابتدا درون ماسه سترون کشت، (از محلول غذایی هوگلند برای تأمین مواد غذایی استفاده شد) و نشاهای چهار برگی مشابه به گلدان‌های حاوی حدود یک و نیم کیلو ماسه سترون منتقل گردید. در تیمارهای حاوی قارچ میکوریز، 15 درصد بستر مایه تلقیح (25-20 اسپور در هر گرم مایه تلقیح) اضافه شد مایه‌زنی گیاهان در تیمارهای دریافت کننده نماتد به روش هوسی و همکاران (22) و با 5000 تخم و لارو در هر گلدان، چهار هفته پس از مایه‌زنی قارچ انجام گرفت.

استخراج عصاره پروتئینی

استخراج عصاره پروتئینی نمونه‌ها به روش چن و همکاران (9) (با تغییرات اندک) و برای تهیه بافرهای مورد نیاز در مراحل مختلف تحقیق از روش استول و بلانچارد (47) استفاده شد. به این صورت که یک گرم از بافت ریشه با ازت مایع به‌صورت پودر نرم ساییده و یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم 100 میلی‌مول اضافه و یکنواخت گردید. پس از حذف بقایای گیاهی حل نشده، محلول حاصل به مدت 20 دقیقه در 13000 دور سانتریفیوژ گردید. محلول رونشت حاصل به‌عنوان عصاره پروتئینی جدا گردید.

تعیین پروتئین کل

ارزیابی کل پروتئین محلول به روش برادفوردانجامشد (6). بدین صورت که ابتدا باحل 100 میلی‌گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو در 50 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد حل و اضافه کردن تدریجی 100 میلی‌لیتر اسیدفسفریک 85 درصد (وزن به حجم) به آن در روی شیکر و رساندن حجم نهایی به یک لیتر معرف لازم تهیه شد جهت تهیه محلول پروتئین استاندارد، باغلظت یک میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر محلول پنج میلی‌گرم بخش IV آلبومین سرم گاوی در پنج میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم حل و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

با تهیه غلظت‌های مختلف از پروتئین استاندارد به کمک معرف برادفوردو اندازه‌گیری جذب نور هر غلظت با اسپکتروفتومتر، منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌های مورد بررسی رسم گردید. به کمک منحنی مذکور، مقدار کل پروتئین محلول هر نمونه گیاهی به صورت میلی‌گرم پروتئین در هر گرم بافت تازه گیاه محاسبه گردید.

ارزیابی فعالیت آنزیم کیتیناز

ارزیابی فعالیت کیتیناز به طریق رنگ‌سنجی و طبق روش بولر و ماخ انجام شد (5). در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور هر نمونه در طول موج حداکثر 585 نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت کیتیناز هر نمونه گیاهی بر اساس میزان ان- استیل گلوکزآمین آزاد شده (میکرومول) به وسیله هر میلی‌گرم پروتئین عصاره و هر گرم بافت گیاه محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه گوجه‌فرنگی در آزمایش اول نشان‌دهنده تفاوت قابل ملاحظه فعالیت آنزیم بین گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ با گیاهان شاهد در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری بود. مقایسه میانگین دو تیمار در مجموع چهار مرحله نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان شاهد بود (شکل 1). به عبارت دیگر در تمام مراحل اندازه‌گیری، میزان فعالیت آنزیم در گیاهان میکوریزی بیش از گیاهان شاهد بود. با این‌حال میانگین فعالیت آنزیم در مراحل مختلف اندازه‌گیری در گیاهان تلقیح نشده با قارچ (شاهد) تفاوت معنی‌دار با

هم نداشتند ولی در گیاهان میکوریزی با آن‌که در مراحل اول (سه مرحله) اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم تفاوت معنی‌دار نداشت ولی در مرحله چهارم فعالیت آنزیم با مراحل دیگر اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول 1). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در سه هفته اول که هنوز کلونیزاسیون قارچ کامل نشده، بر تحریک فعالیت آنزیم در گیاه افزوده می‌شود ولی پس از کلونیزاسیون کامل افزایش چندانی در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود و فعالیت آنزیم در حد گیاهان شاهد کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های دوماس و همکاران (14) در مورد افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه‌های توتون میکوریزی و هم‌چنین یافته‌های والپین و همکاران در مورد ریشه یونجه تلقیح شده با *G. intraradices* تطابق دارد (51 و 14).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مرکب و مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کیتیناز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود (جدول 1). بااین‌حال بین زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی، تفاوت‌ها در بیشتر موارد معنی‌دار نبود. بدین ترتیب که میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، نماتد به تنهایی و قارچ میکوریز به تنهایی، در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری تفاوت معنی‌دار نشان ندادند و بین میانگین‌های شاهد و نماتد به تنهایی نیز در تمام زمان‌ها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. به عبارت دیگر وجود نماتد ریشه‌گرهی تأثیر معنی‌داری در افزایش فعالیت کیتیناز در ریشه گوجه‌فرنگی نداشت. در گیاهان میکوریزی علیرغم فقدان تفاوت معنی‌دار در فعالیت آنزیم بین زمان‌های مختلف اندازه‌گیری، میانگین‌ها در تمام زمان‌ها بالاتر از میانگین‌های همان زمان‌ها در تیمارهای شاهد و نماتد به تنهایی بود. به عبارت دیگر وجود قارچ میکوریز موجب افزایش فعالیت آنزیم مذکور شده بود. در گیاهان میکوریزی مایه‌زنی شده با نماتد ریشه‌گرهی،میانگین فعالیت آنزیم چهار روز بعد از مایه‌زنی با نماتد (اندازه‌گیری دوم) بیشترین مقدار را دارا بود (شکل 2) و با سایر زمان‌های اندازه‌گیری تفاوت معنی‌دار داشت. هر چند میانگین فعالیت آنزیم زمان مذکور با زمان‌های مختلف گیاهان میکوریزی بدون نماتد نیز تفاوت معنی‌دار داشت ولی میانگین فعالیت آنزیم در سایر زمان‌های گیاهان میکوریزی مایه‌زنی شده با نماتد با میانگین زمان‌های مشابه در گیاهان میکوریزی بدون نماتد تفاوت معنی‌دار نداشتند. از مقایسات فوق می‌توان نتیجه گرفت که استقرار قارچ میکوریز آربوسکولار روی ریشه گوجه‌فرنگی می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز گردد. میزان فعالیت کیتیناز در شرایط معمول در گیاه پایین است ولی در پاسخ به تحریکات مختلفی هم‌چون اتیلن، اسید سالیسیلک و آلودگی‌های مختلف قارچی و ویروسی میزان آن افزایش می‌یابد. تحقیقات روی گیاهان مختلف مانند یونجه و تره‌فرنگی نیز نشان داده است که میزان فعالیت آنزیم در مراحل اولیه کلونیزاسیونقارچ‌های میکوریز آربوسکولار افزایش یافته ولی در مراحل بعدی افزایشی رخ نمی‌دهد (46 و 51). بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با قارچ‌های میکوریز نشان‌دهنده بالاتر بودن فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی بوده است (33).

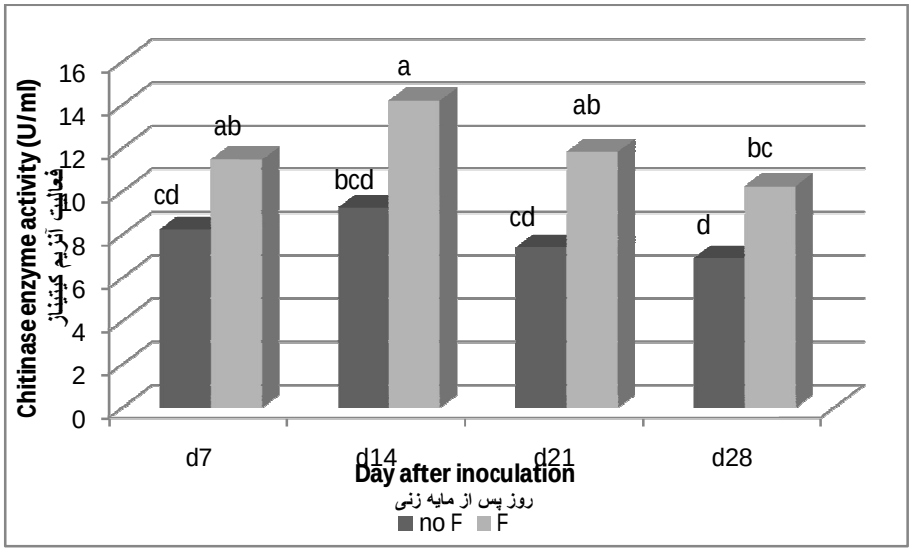
در این مطالعه نماتد به تنهایی نتوانست باعث تحریک افزایش فعالیت کیتیناز شود ولی هنگامی که قارچ میکوریز وجود داشت مایه‌زنی نماتد باعث افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم در مراحل آغازی حمله نماتد گردید. این موضوع می‌تواند مؤید نقش مثبت قارچ میکوریز در تحریک دفاع گیاه در مقابل حمله نماتد باشد.

جدول 1- میانگین‌های فعالیت آنزیم کیتیناز در تیمارهای مختلفبرهمکنش قارچ میکوریز*Glomus mosseae*و نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*روی گوجه‌فرنگی

Table 1- Means of chitinaseactivityindifferent treatments of interactionofmycorrhizal fungus (*Glomus mosseae)* and root-knot nematode (*Meloidogyne javanica)* on tomato

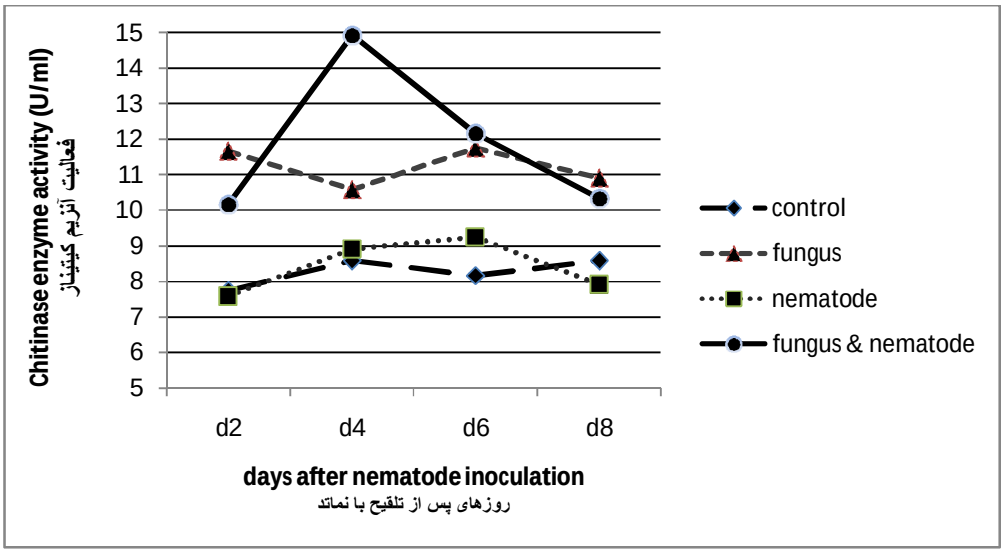
Timeafter inoculationwithnematode(day) زمان بعد از تلقیح با نماتد (روز)				
Treatment تیمار	2	4	6	8
Control شاهد	7.75^{f}	8.58 ^{def}	8.16 ^{def}	8.58 ^{def}
Fungus قارچ	11.66^{b}	10.58 ^{bcd}	11.75^{b}	10.91 ^{bc}
Nematode نماتد	7.58 ^{f}	8.91^{cdef}	9.25 ^{cdef}	7.91 ^{f}
Fungus+nematode قارچ+نماتد	10.16 ^{bcde}	14.93 ^{a}	12.16 ^{b}	10.33^{bcd}

اعداد جدول میکرومول ان استیل گلوکز آمین در میلی‌لیتر عصاره هر گرم بافت ریشه و میانگین سه تکرار می‌باشند.
میانگین‌های با حروف مشابه در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.



شکل 1- مقایسه میانگین تغییرات فعالیت کیتیناز در گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با قارچ میکوریز و گیاهان شاهد (بدون میکوریز)

Figure 1- Mean comparison ofthechitinaseactivitychangesinmycorrhizaltomatoplants and non-mycorrhizal plants



شکل 2- تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه گوجه‌فرنگی‌های مایه‌زنی نشده و مایه‌زنی شده با قارچ میکوریز و نماتد به تنهایی و در ترکیب با هم

Figure 2- Changes ofchitinase activity in root of tomatoes non-inoculated and inoculated with mycorrhizal fungus and nematode alone and together

با توجه به فعالیت حداکثری آنزیم در روز چهارم بعد از مایه‌زنی با نماتد و بیشترین فعالیت آنزیم در گیاهان دو هفته بعد از تلقیح با قارچ میکوریز (آزمایش اول)، بخش مهمی از کاهش بیماری‌زایی نماتد در حضور قارچ را می‌توان به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت داد (45).بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و نتایج آزمایشات مشابه (3، 7، 17، 43 و 48). تحریک فعالیت آنزیم کیتیناز توسط قارچ‌های میکوریز می‌تواند عامل آمادگی گیاه در مقابل حمله بعدی نماتد و کاهش خسارت آن باشد (40). با توجه به نحوهٔ فعالیت نماتد و قارچ و ارتباط متقابل آن‌ها با گیاه به نظر می‌رسد که قارچ با تحریک سیستم دفاعی گیاه و اختلال در فعالیت نماتد باعث کاهش میزان ظهور گال،تعداد توده تخم و تعداد تخم داخل هر توده تخم می‌گردد (45).این موضوع در کنترل نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) توسط قارچ میکوریز *G. versiforme* در گیاه انگور نیز مورد تأیید قرار گرفته است (26).

منابع

1- Auge R. 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza, 11:3-42.
2- Azcon-Aguilar C., and Barea J.M. 1996. Arbuscularmycorrhizal and biological control of soil born plant pathogens on overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza,6: 457-464.
3- Bagyaraj D.J., Manjunath A., and Reddy D.D.R. 1979. Interaction of vesicular arbuscularmycorrhiza with root-knote nematodes on tomato. Plant Soil, 51: 397-403.
4- Barea J. M., Azcon, R., and Azcon-Anguilar C. 2002. Mycorrhizospher interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie van leeuwenhoek. Plant and Soil, 81: 342-351.
5- BollerT., and Mauch F. 1988. Colorimetic assay for chitinase. Pp 430-435 in Wood W.A., and Kellogg S.T. Methods in Enzymology, vol . 161, part B: lignin, pectin and chitin, Academic press, san diego.
6- Bradford M.M. 1976. Rapid and Sensitive method for the quanititation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
7- Bodker L., Kjoller, R., Kristensen K., and Rosendahl, S. 2002. Interactions between indigenous arbuscularmycorrhizal fungi and *Aphanomyceseuteiches*in field-grown peas. Mycorrhiza, 12: 7–12.
8- Byrne N.D., Duxbury M., and Sharpe N. 2001. The determination of chitinase activity of prapers:an introductory enzyme assay. Biochemistry and Molecular Biology Education, 29: 144-146.
9- Chen C., Belanger, R.R., Benhaou N., and Paulitz T.C. 2000. Defens enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria and *pythiumaphanidermatum*.plant pathology, 56: 13-23.
10- Chen P., and Robert P.A. 2003. Virulence in *M.hapla*differetiat by resistance in common beant. Nematology, 5:39-47.
11- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikklsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U.,andVadK. 1993. Plant Chitinase, 3: 31–40.
12- Dahiya N., Tewari R., Tiwari R.P., and Hoondal G.S. 2005. Chitinase from *Entrobacter* spp. NRG4: its purification , characterization and reaction pattern. Journal of Biotechnology, Vol8,no.2.
13- David B., Colling A., Karsten M., kragh C., Jsrn D., Mikkelsen R., Klaus K., Nielsen R., and Knud V. 1993. Plant Chitinase, 3: 31-40.
14- Dumas-Gaudot E., Furlan V., Grenier J., and Asselin A. 1992. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular- arbuscularmycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 1 :133–136.
15- Elsen A., Declerck S., and DeWaele,D. 2002. Effect of three arbuscularmycorrhizal fungi on root-knot nematode *(Meloidogyne*spp.) infection of Musa. Infomusa, 11:21-23.
16- Francle L.J. 1993. Interaction of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In: Kan MW (ed) Nematode Interactions. Champan and Hall, London, UK, pp 203-216.
17- Forge T., Muehlchen A., Hachenberg C., Neilsen G., and Vrain T. 2001. Effects of preplant inoculation of apple with arbuscularmycorrhizal fungi on population growth of the root lesion nematode, *pratylenchuspenetrans*. Plant Soil, 236:185-196.
18- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M. 2004. *Trichoderma*speciesopportunistic.NatureReviewsMicrobiol, 2(1): 43-56.
19- Harrier, L.A., and Watson, C.A. 2004. The potential role of arbuscularmycorrhizal fungi in the bioprotection of plant against soil-borne pathogens in organic and or sustainable farming systems. Pest Manage, 60: 149-157.
20- Hol W.H.G., and Cook R. 2005. An overview of arbuscularmycorrhizal fungi- nematode interactions. Basic Applied Ecology, 6:489-503.
21- Hooker J.E., Jaizme-Vega M., and Atkinson D. 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscularmycorrhizal fungi. Impact of arbuscularmycorrhizas on sustainable. Agriculture Natural Ecosystem, ALS, pp 191-200.
22- HusseyR.S., and Barker K.R. 1973. A comparsion of methods of collecting inocula of *Meloidogynespp*.Including a new technique. Nematology, 57,1025-1028.
23- Jenkins W.R. 1964. A rapid centrifugal technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 672-693.
24- Kombrink E., Shroder M., and Halbroch K. 1988. Several pathogenesis velated proteins in potato are 1,3-B glucanases and chitinase. Journal ofBotany, 85:782-786.
25- Lambais M.R,.andMehdy M.C. 1995. Differential expression of defens related gens in arbuscularmycorrhiza. Journal of Botany, 73: 533-540.
26- Li H.Y., Liu R.J., and Shu H.R. 2002. Interaction between AM fungi and *Meloidogyne incognita* andtheir effects on the host plant grape. ActaHorticult. Sin, 6:510-514.
27- Linderman R.G. 2000. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to disease. ArbuscularMycorrhizas: Physiology and Function, pp 345-367.

28- Menge J.A., Powell C.L., and Bagyaraj D.P. 1984. Inoculum production. In: (Eds.). VA Mycorrhiza. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA. VA Mycorrhiza, pp187-199.

29- MerzendorferH., and Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regula of chitin synthases and chitinase. J EXP Biol, 206: 4393-412.

30- Ozgonen H., BiciciM., and Frkilic A. 1999. The effect of salicylic acid and endoycorrhizal fungus *Glomusintraradices* on plant development of tomato and *Fusarium* wilt caused by *Fusariumoxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Turkish Journal Agriculture Forest, 25: 25-29.

31- Pan S.Q., Ye X.S., and Kuc J. 1992. Induction of chitinase in tobacco plants systemically protected against blue mold by *peronosporatabacina*or tobacco mosaic virus. Phytopathology, 82: 119-123.

32- PhillipsJ.M., and Hayman D.S. 1974. Improved procedures clearing root and staining parasitic and vesicular arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment of infections. Transaction of British Mycological Society, 55: 158-161.

33- Pozo M.J., Azcon-Aguilar C., Dumas-Gaudot E., and BareaJ.M . 1998. Chitosane and Chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscularmycorrhizal fungi or *Phytophthoraparasitica*. Journal of experimental Botany, Vol. 49. 1729-1739.

34- Pozo M.J., Azcon-Aguilar C., Dumas-Gaudot E., and Barea J.M. 1999. Beta-1-3 glucanase activities in tomato roots inoculated with the arbuscularmycorrhizal fungi and or *Phytophthoraparasitica* and their possible involvement in bioprotection. Plant Science, 14:149-157.

35- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M., and Azcon Aguilar C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscularmycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. Journal of Experimental Botany, 53: 525-534.

36- Pozo M.J., Dumas-Gaudot E., Slezack S., Gianinazzi-Pearson V., Azcon-Aguilarc C., and Barea J.M. 1996. Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interaction with *Glomusmosseae* and *Phythophthoranicotiana*var*parasitica*. Agronomie, 16:689-97.

37- RezaeeDanesh Y., MohammadiGoltapeh A., Alizadeh A., and Varma A. 2007. Studies on taxonomy and in vitro culturing possibility soybean and alfalfa-associated arbuscularmycorrhizas in Iran. Ph.Dthesis. Plant protection Department, Faculty of agriculture. TarbiatModarresuniversity, Pp 346.

38- Richard A., and Emilio F. 2005.Plant parasitic in subtropical and tropical agricultur , CABI International, Pub, 319p.

39- Roserwarne G.M., Barker S.J., and Smith S.E. 1997. Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. Printed in Great Britain,Mycorrhiza, 101(8): 966-970.

40- SasserJ.N., and Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A. and Dickson, D.W. (eds). Vista on Nematology. Society ofNematologist, pp 7-14.

41- SaeedAkhtarM., and Siddiqui Z.A. 2008. Biocontrol of a root rot disease complex of chickpea by *Glomusintraradices*, *Rhizobium* sp. And *Pseudomonas straita*. Mycology and Plant Pathology, 410-417.

42- Saeedzadeh A., Kheiri, A., Okhovvat S.M., and Hoseininejad A. 2003. Study on interaction between root-knot nematode *Meloidogynejavanica* and wilt fungus *Verticillium dahlia* on olive seedlings in greenhouse. Communication Applied Biological Science, 68: 139-143.

43- SiddiquiZ.A., and Mahmood I. 1998. Effect of a plant growth promothing bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogynejavanica* on tomato. Applied Soil Ecology, 8:77-84.

44- Smith S.E., and Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. Academic Press, London.

45- Sohrabi F., Fadaei-Tehrani A.A., RezaeeDanesh Y., and Jamalli-Zavareh A. 2012. . Study on interaction between arbuscularmycorrhizal fungi (*Glomusmosseae* and *Glomusintraradices*) and root-knot nematode (*Meloidogynejavanica)* in tomato. Journal of Plant Pathology ,Vol. 48, No. 3, 2012: 131 -134.

46- Spanu P., Boller T., Ludwig A., Wiemken, A. Faccioa A., and Bonfante-Fasolo P. 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal*AlliumPorrum* regulation and localization. Planta, 177: 447-550.

47- Stol V.S., and Blanchard J.S. 1990. Buffers: Principles and Practice. Pp 24-38 in Deutscher M.P. methods in Enzymology. Vol. 182: Guide to protein purification. Academic press. San diego.

48- **S**troble N.E.1981. Interactions of Vesicular ArbuscularMycorrhizal Fungi, *Meloidogyne incognita*, and Soil Fertility on Peach. Ecology and Epidemiology, 72:690-694.

49- TaylorD.P., and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of Meloidogyne spp. Nematologica, 20: 268-269.

50- Trudgill D.L., and Block V.C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knotnematodes: dxceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens.Annual Review of Phytopathology, 39:53-77.

51- Volpin H., Elkind Y., and Kapulnik Y. 1994. A Vesicular ArbuscularMycorrhizal fungus (*Glomusintraradices*) induces a defense response in alfalfa roots. Plant Physiology, 104: 683-689.

52- Wen C.M., Tseng C.S., Cheng C.Y., and Li Y.K. 2002. Purification, characterization and cloning of chitinase from Bacillus sp. NCTU2, Biotechnology Applied Biochemistry, 35: 213-219.

53- Yan Li H., Yang G.D., Shu H.R., Yang Y.T., Ye B.X., Nishida I., and Zheng C.C. 2006. Colonization by the ArbuscularMycorrhizal Fungus *Glomusversiforme*Induces a DefenseResponseAgainst the Root-knot Nematode *Meloidogyneincognita* in the Grapevine (*Vitisamurensis*Rupr.), Which IncludesTranscriptional Activation of the Class III Chitinase Gene VCH3. Plant Cell Physiology, 47: 154–163.

54- ZhangY.Y., and Punja Z.K. 1994. Induction and characterization of chitinase pathogen inoculation . Plant Science, 99:141-150.

55- Zhong W.F., Jiang L.H., Yan W.Z., Cai P.Z., Zhang Z.X., and Pei Y. 2003. Cloning and sequencing of chitinase gene from Bacillusthuringiensissubsp*israelensis*. ChunaXueBao, 30: 364-369.