Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

بررسی ارتباط میان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های ایرانی قارچ *Ascochyta rabiei*

مصطفی مطلبی[۱]، محمدرضا زمانی[۲] و اباصلت حسین‌زاده کلاگر[۳]

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در نخود (Cicer arientinum) ، بیماری برق‌زدگی است، که توسط قارچ Ascochyta rabiei ایجاد می‌شود. در این پژوهش ۴۳ جدایه از قارچ Ascochyta rabiei از بذور و گیاهان آلوده نخود، خالص‌سازی گردید، که از مناطق مختلف استان‌های کرمانشاه، لرستان، همدان، کردستان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در طول سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۷۸ جمع‌آوری شده بود. برای تعیین شدت بیماری‌زایی، از محیط کشت CDA (Chickpea seed meal dextrose agar) استفاده گردید. در این روش، هر جدایه تحت شرایط آزمایشگاهی روی محیط CDA در دمای ۲۱±۱ °C به مدت ۹ روز کشت داده شد. آسیب‌های ناشی از حمله قارچ به قسمت‌های مختلف گیاهچه‌های نخود رقم جم به طور روزانه تا روز پنجم ارزیابی، و از صفر تا صد درصد درجه‌بندی شد.

نتایج نشان داد که ۱۳ جدایه (IE06، IE04، IO00، IL10، IL01، IK21، IK19، IK17، IK14، IK13، IK10، IK08 و IK04) با شدت بیماری‌زایی زیاد (Highly virulent, HV) و هفت جدایه (IL06، IL04، IE08، IE01، IK15، IK06 و IK03) با شدت بیماری‌زایی کم (Weakly virulent, WV) هستند. جدایه‌های دیگر دارای شدت بیماری‌زایی متوسط (Moderately virulent, MV) بودند. فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز این جدایه‌ها روی محیط کشت PZ (Pectin zymogram) اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده با آزمون بیماری‌زایی حاصل از ۴۳ جدایه نشان داد که جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی زیاد در گروه بیماری‌زایی شدید، و جدایه‌های با فعالیت آنزیمی کم در گروه بیماری‌زایی کم قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: *Ascochyta rabiei، بیماری‌زایی، آنزیم پلی‌گالاکتوروناز*

۱. دانشیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار بیولوژی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

مقدمه

بیماری برق‌زدگی نخود یا Ascochyta blight یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود *(Cicer arientinum)* است، که عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrnsse بوده (۱۵)، و به عنوان یک فاکتور اصلی محدود کننده تولید نخود محسوب می‌شود (۲٤). برق‌زدگی نخود از متداول‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های نخود ایرانی در ایران و ۳۲ کشور جهان است (۱۳ و ۱۹). این بیماری را نخستین بار زالپور (۳۱) در ایران گزارش کرد. این بیماری تا کنون در استان‌های مختلفی از ایران مانند آذربایجان، مازندران، مرکزی، خوزستان، خراسان، فارس، زنجان، ایلام، همدان و کرمانشاه گزارش شده است (۱ و ۳۰). در صورت فراهم بودن شرایط مناسب دمایی (۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت برای رشد قارچ در فصل رشد، این قارچ توانایی ایجاد خسارت زیادی را داراست، که با فراگیر شدن بیماری، این میزان می‌تواند تا صد درصد محصول را از بین ببرد (٦، ۱۸ و ۲۵).

نن و ردی (۱۹) پنج گروه بیماری‌زا و چندین نژاد از قارچ *A. rabiei* را در میان جدایه‌های جمع‌آوری شده از پاکستان و ترکیه مشخص کردند. گاون و همکاران (۱۱) جدایه‌های قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از ۱۱ کشور مختلف را از نظر بیماری‌زایی بررسی کرده و نشان دادند که تفاوت‌های زیادی در بیماری‌زایی این جدایه‌ها وجود دارد. جن و وایز (۱۲) شدت بیماری‌زایی ۳۹ جدایه قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از کشت‌های تجاری آلوده به بیماری برق‌زدگی در شمال آیداهو و جنوب واشنگتن را بررسی کرده، ۱۱ گروه با شدت بیماری‌زایی مختلف تشخیص دادند. فیشر و همکاران (۱۰) ۳۰ جدایه *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایتالیا را از نظر شدت بیماری‌زایی مطالعه و دسته‌بندی کردند. یونسی و همکاران (۲۹) ۳۰ جدایه قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کرمانشاه را از نظر تنوع شدت بیماری‌زایی بررسی، و آنها را به ۱۲ گروه بیماری‌زا تقسیم کردند.

پاتوژن‌های گیاهی مقدار زیادی آنزیم تولید می‌کنند که قادر به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند (۲۰). توانایی پاتوژن‌های گیاهی برای تولید آنزیم‌هایی که پلی‌ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه می‌کنند، احتمالاً نخستین مرحله در فرایندهای بیماری‌زایی است (۲۱ و ۲۲). این آنزیم‌ها معمولاً ترشحی هستند و دارای وزن ملکولی کم می‌باشند (۷ و ۸). آنزیم‌های مذکور معمولاً به صورت ایزوآنزیم‌های مختلفی تولید می‌شوند که از نظر اندازه، بار الکتریکی، پایداری و توانایی برای تخریب دیواره‌های سلول مختلف هستند (۵، ۷ و ۱۷).

از ایزوآنزیم‌های شناخته شده در *Ascochyta rabiei* می‌توان فسفاتازهای اسیدی (Acid phosphatases) و فسفاتازهای بازی (Alkaline phosphatases)، مالات دهیدروژناز (Malate dehydrogenases)، استرازها (Esterases)، شیکیمیک دهیدروژناز (Shikimic dehydrogenases)، و پلی‌گالاکتورونناز (Polygalacturonase) را نام برد (۳ و ۲٦).

تخریب و خشک شدن نواحی آلوده با تخریب دیوارهٔ سلولی توسط آنزیم‌های مترشحه از پاتوژن صورت می‌گیرد. برای نخستین بار تنحاکن و بارز (۲٦) در سال ۱۹۹۱ وجود آنزیم پلی‌گالاکتورونناز ترشحی را در قارچ *Ascochyta rabiei* ثابت کردند، و نشان دادند که این آنزیم یکی از فاکتورهای اساسی بیماری‌زایی این قارچ است. امروزه برنامه‌های پژوهشی گسترده‌ای در بارهٔ تأثیر متقابل نخود و قارچ *Ascochyta rabiei* صورت می‌پذیرد، که یکی از آنها بررسی ایزوآنزیم‌های نژادهای مختلف قارچ در نخودهای مقاوم به برق‌زدگی است (۱٤).

در این پژوهش جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، از نظر شدت بیماری‌زایی و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونناز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei*: چهل و سه جدایه قارچ *A. rabiei*، که در طول این پژوهش بررسی گردید از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و خالص‌سازی شد (جدول ۱).

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

جدول ۱. جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

کد نمونه	محل جمع‌آوری	تاریخ	کد نمونه	محل جمع‌آوری	تاریخ
IK01	کرمانشاه/ درود فرامان- کرانی	۷۶/۳/۷	IL01	لرستان/ کرم‌آباد- حومه	۷۷/۳/۲۰
IK02	کرمانشاه/ دینور- گنداب سفلی	۷۶/۳/۲۲	IL03	لرستان/ کرم‌آباد- حومه	۷۷/۳/۲۲
IK03	کرمانشاه/ تالان‌دشت- حومه	۷۵/٤/٦	IL04	لرستان/ فیروزآباد- حومه	۷۷/۳/۲
IK04	کرمانشاه/ ماهی‌دشت- قیماس	۷۵/۲/۳۱	IL06	لرستان/ الشتر- حومه	۷۷/۱/۲۷
IK05	کرمانشاه/ گیلان‌غرب- حومه	۷۷/۲/۲٤	IL07	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۳۰
IK06	کرمانشاه/ ماهی‌دشت- حومه	۷۷/۲/۲٤	IL09	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۱٤
IK07	کرمانشاه/ صحنه- حومه	۷۷/۳/۱۵	IL10	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۱٤
IK08	کرمانشاه/ کنگاور-حسن‌آباد	۷۷/۳/۱۵	IO00	کردستان/ مریوان- زریبار	۷۷/٤/۱۱
IK10	کرمانشاه/ سرارود- حومه	۷۷/۲/۲۷	IE01	آذ- غربی/شبستر- حومه	۷۷/٤/۳
IK11	کرمانشاه/ سرارود- حومه	۷۷/۲/۲۷	IE02	آذ- غربی/ شبستر - حومه	۷۷/٤/۱۵
IK12	کرمانشاه/ سرپل ذهاب- سرآبگرم	۷۷/۳/۲۹	IE04	آذ- غربی/ شبستر- حومه	۷۷/٤/٦
IK13	کرمانشاه/ سنقر- حومه	۷۷/٤/۲۲	IE05	آذ- غربی/ اهر- حومه	۷۷/٤/۱٤
IK14	کرمانشاه/ سرپل ذهاب- حومه	۷۷/۲/۲٤	IE06	آذ- غربی/ اهر- حومه	۷۷/٤/۱٤
IK15	کرمانشاه/ سرارود- حومه	۷۷/۳/۲۰	IE09	آذ- غربی/ خسروشهر- تسوج	۷۷/٤/۱۵
IK16	کرمانشاه/ گیلان‌غرب- چله	۷٤/٤/۸	IE10	آذ- غربی/ خسروشهر- تسوج	۷۷/٤/۱۵
IK17	کرمانشاه/گیلان‌غرب- چشمه نظامی	۷۷/۲/۲٤	IW01	آذ- شرقی/ ارومیه- سرو	۷۷/٤/۲۳
IK18	کرمانشاه/ سرارود- حومه	۷۷/۲/۲۱	IW02	آذ- شرقی/ ارومیه- شاهین دژ	۷۷/٤/۲
IK19	کرمانشاه/ روانسر- حومه	۷۷/۲/۲۷	IK28	کرمانشاه/ سنقر- حومه	۷۷/۳/۲۵
IK20	کرمانشاه/ هرسین- رایگان	۷٤/٤/۳	IK25	کرمانشاه/ هرسین- حومه	۷۷/۳/۱۰
IK21	کرمانشاه/ هرسین- الیاسوند علیا	۷٤/٤/۳	IK26	کرمانشاه/ کنگاور- اکبرآباد	۷٤/۳/۲۲
IK22	کرمانشاه/ کوزران- حومه	۷۷/۲/۱۲	IK27	کرمانشاه/ اسدآباد- حومه	۷۷/۳/۱۵
IK23	کرمانشاه/ سنقر- ظلم‌آباد	۷٤/٤/۱۱			

IK= جدایه‌های کرمانشاه ؛ IL= جدایه‌های لرستان ؛ IO= جدایه‌های کردستان؛

IE= جدایه‌های آذربایجان شرقی ؛ IW= جدایه‌های آذربایجان غربی

محیط کشت نگهداری قارچ: برای نگهداری قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده گردید. برای انجام آزمون بیماری‌زایی قارچ، محیط کشت Chickpea Dextrose Agar (CDA) به کار رفت. به منظور تهیه این محیط کشت ٤۰ گرم آرد نخود در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و عصاره حاصل با پارچه کتانی صاف شد. سپس به محلول حاصل ۲۰ گرم Dextrose (Merck) و ۱۸ گرم Agar (Merck) افزوده شد. پیش از سترون کردن در اتوکلاو، حجم نهایی به

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

یک لیتر رسانده شد و pH آن برابر ٦/٥ تنظیم گردید.

محیط کشت زایمـــوگرم (Pectic Zymogram medium, PZ): برای فراهم کردن شرایط مناسب تولید آنزیم‌های پکتینی توسـط جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei* **از** محیط کشت PZ معرفـی شده به وسیلهٔ سویتینگهام و همکاران (۲۳) اسـتفاده گردیـد. ده گرم پکتیـن (Citrus pectin, Merck) در ۱۰۰۰ میلی‌لیـتر آب مقطر حل، و بـه آن۲۰ گرم آگار، ۲/٦٤ گرم سـولفات آمونیـوم، ۰/۳٤ گرم دی‌پتاسـیم هیـدروژن فسـفات و۰/۱٤ گرم سـولفات منیزیم افزوده شد. pH محیط فوق برابر ٤/٥ تنظیم گردید. بـرای تهیه محیط کشت مزبور به صـورت مـایع، طبـق همیـن دسـتور بدون افزودن آگار باید عمل کرد.

آزمون بیماری‌زایی: برای تعیین شدت بیمـاری‌زایی، جدایـه‌های مختلف قارچ روی محیط کشـت CDA کشـت داده شـد، و در دمای ۲۲/٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا قطر کلنی قارچ به چـهار سـانتی‌متر برسـد. از سـویی، نخودهـا (رقـم جـم) بـا پرکلرات سدیم ۰/۲٥ درصد بـه مـدت پنـج دقیقـه ضدعفونـی گردید. سپس با آب مقطـر سـترون شست‌شـو داده شـد. آنـگاه نخودها در داخل پلیـت سـترون و مرطـوب قـرار گرفتـه، پـس ازجوانـه زدن نخودهـا، طبـق روش یـانگ (۲۸) و دولمـانس و همکاران (۹) گیاهچه‌ها مماس بر کلنی قارچ قرار داده شد و تـا مـدت ۱۲۰ سـاعت در دمـای ۲۲/٥ نگهـداری گردیـد. هـر ۲٤ ساعت یک بار از گیاهچه‌های آلوده یادداشت‌برداری شد. در هر مورد سه تکرار و در هر تکـرار هشـت گیاهچـه بررسـی شـده، سرانجام درصـد آلـودگی ایجـاد شـده در گیاهچـه‌ها بررسـی و ارزیابی گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونـاز: بـرای بررسـی مـیزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتورونـاز توسط قارچ *A. rabiei*، جدایـه‌های مختلف به طور جداگانه در ۱۰ml محیط کشت PZ بـا بـه‌هم‌زن (۱۰۰ دور در دقیقه) کشت داده شد. پس از شش روز میسـلیوم قارچ‌ها در محیط‌های کشت مربوطه توسط کاغذ صـافی واتمـن شماره یک جمع‌آوری شده، محیـط صـاف شـده بـه مـدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سـانتریفوژ (۱۲۰۰۰×g) گردید. محلول به دست آمده به عنوان محلول حاوی آنزیم‌هـای مترشحه در مراحل بعدی به کار رفت.

فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونـاز با استفاده از روش کـالمر (٤) همراه با کمی تغییر، به شرح زیر اندازه‌گیری گردید:

٤۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بـا ۲۱۰ میکرولیـتر محلـول ذخیره سوبسـترا حـاوی ۰/۳ درصـد (w/v) پلـی‌گالاکتورونیـک اسید در لوله اپندورف مخلوط شده و برای مـدت ۲۰ دقیقـه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. واکنش بـا افـزودن ۲٥۰ میکرولیتر معرف مس [۱٪ (w/v) سدیم پتاسـیم تارتـارات، ۲٪ (w/v) کربنات سدیم، ۰/۳٪ (w/v) سدیم هیدروژن کربنـات و ۱٤٪ (w/v) سولفات سدیم]، و نـیز قـرار دادن در حمـام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سـرد شـدن، ٥۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبدات [٥٪ (w/v) آمونیوم مولیبـدات، ۰/٦٪ (w/v) دی‌سدیم هیدروژن آرسـنات و ٤/۲٪ (w/v) اسـید سـولفوریک ۹٦٪] بـه مخلـوط اضافـه و سـانتریفوژ شـده (۱۲۰۰۰×g)، جذب نوری در طول موج ٥۰۰ نانومتر بـه وسـیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بـرای هـر جدایـه در سـه تکـرار انجـام شـد. در ایـن آزمـایش از دی-گالاکتورونیک اسید به عنـوان اسـتاندارد اسـتفاده شـد. در ایـن شرایط، یک واحد آنزیم در مـدت ۲۰ دقیقـه، یـک میکرومـول اولیگوگالاکتورونیک تشکیل می‌دهد.

نتایج

در این پژوهش ٤۳ جدایه قارچ *A. rabiei* جمـع‌آوری شـده از مناطق شمال غرب و غرب کشور، شامل اسـتان‌های آذربایجـان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، لرسـتان و کرمانشـاه، از نظـر شدت بیمـاری‌زایی بررسـی گردیـد. بدیـن منظـور، نخودهـای جوانه‌زده در تماس با کلنی جدایه‌های قارچ قرار داده شد، و در فواصل زمانی ٤۸، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت مـیزان آلـودگی ایجـاد شده به گیاهچه‌ها بر حسب درصد آلودگی تعیین شد. برای هـر جدایه قارچ در هر یک از زمان‌های فوق، میزان متوسط آلـودگی ایجاد شده با درصدهـای صفـر، ۲۰، ٤۰ ، ٦۰ ، ۸۰ و ۱۰۰ بیـان

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

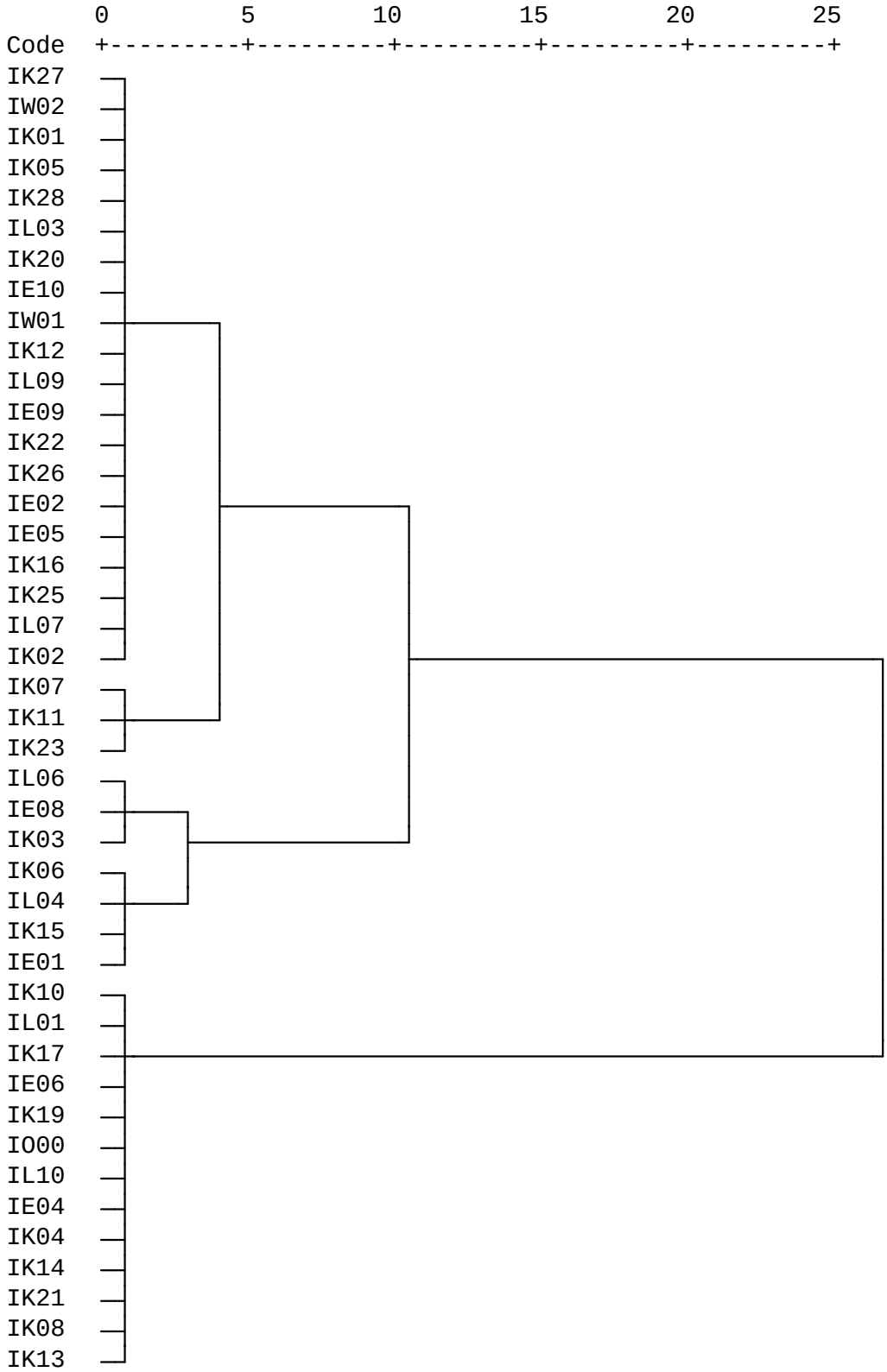
گردید. سرانجام، برای هر جدایه ٢٤ پارامتر (حاصل درصدهای آلودگی در فواصل زمانی) تعیین شد. با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای، ٤٣ جدایه قارچ *A. rabiei* مورد بررسی در این پژوهش، در فاصله پنج، به سه گروه با درجه بیماری‌زایی متفاوت تقسیم‌بندی شدند (شکل ١). تجزیه تابع تشخیص در مورد گروه‌های سه‌گانه‌ای که در فاصله حدود پنج دیده می‌شوند نشان می‌دهد که این گروه‌ها با احتمال صد درصد با یکدیگر اختلاف دارند. بنابراین، تجزیه تابع تشخیص، گروه‌بندی جدایه‌ها را بر اساس تجزیه خوشه‌ای در فاصله حدود پنج تأیید می‌کند. بر این اساس، جدایه‌های مورد بررسی از نظر شدت بیماری‌زایی در سه گروه واقعی (کلاستر) قرار می‌گیرند. این سه گروه به ترتیب دارای ٢٣ جدایه با شدت بیماری‌زایی متوسط (٢٥ تا ٤٧/٥ درصد) به عنوان MV (Moderately virulent)، هفت جدایه با شدت بیماری‌زایی کم (کمتر از ٢٥ درصد) به عنوان WV (Weakly virulent) و ١٣ جدایه با شدت بیماری‌زایی زیاد (بیشتر از ٤٧/٥ درصد) به عنوان جدایه‌های HV (Highly Virulent) می‌باشند. بنابراین، از میان جدایه‌های مورد بررسی، ١٣ جدایه IE04، IO00، IL01، IK04، IK08، IK10، IK15، IK14، IK13، IK17، IK19، IK21 و IK06 به عنوان HV و هفت جدایه IK15، IL06، IL04، IE01، IE08، IK03 و IK06 به عنوان WV معرفی شدند (شکل ٢).

میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز با اندازه‌گیری محصول ایجاد شده توسط این آنزیم در مخلوط واکنش به وسیله معرف‌های مس و آرسنومولیبدات، بر اساس روش کالمر (٤) تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در جدایه‌های مختلف به روش UPGMA انجام شد. گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر میزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز توسط تجزیه خوشه‌ای در شکل ٣ آمده است. در فاصله حدود پنج، چهار گروه مستقل قابل تشخیص است. تجزیه تابع تشخیص در مورد گروه‌های چهارگانه‌ای که در فاصله پنج دیده می‌شوند نشان می‌دهد که این گروه‌ها با احتمال صد درصد با یکدیگر اختلاف دارند. بنابراین، تجزیه تابع تشخیص، گروه‌بندی جدایه‌ها را بر اساس تجزیه خوشه‌ای در فاصله پنج تأیید می‌کند. افراد موجود در هر یک از گروه‌ها از نظر شاخص تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز صد درصد به گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای تعلق دارند. بر این اساس، جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از نظر تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در چهار گروه واقعی قرار می‌گیرند. این چهار گروه به ترتیب عبارت‌اند از گروه اول شامل هشت جدایه IK03، IK06، IE01، IL04، IL06، IL07، IK15 و IE08 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی کمتر از سه واحد (3U/ml/min) هستند، گروه دوم شامل ٩ جدایه IK05، IL03، IE05، IE09، IK16، IW02، IK07، IK27 و IE10 که میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز آنها ٣-٦ واحد (3-6U/ml/min) می‌باشد، گروه سوم شامل ١٥ جدایه IK01، IK02، IK23، IK26، IK19، IK21، IK20، IK28، IL09، IK25، IK11، IE02، IK12، IK22 و IW01 که فعالیت آنزیمی آنها ٦-٨ واحد (6-8U/ml/min) اندازه‌گیری گردید، و گروه چهارم شامل ١١ جدایه IK17، IL01، IK13، IK08، IL10، IK10، IE06، IK04، IE04، IK14 و IO00 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی بیشتر از ٩ واحد (9U/ml/min) هستند.

بحث

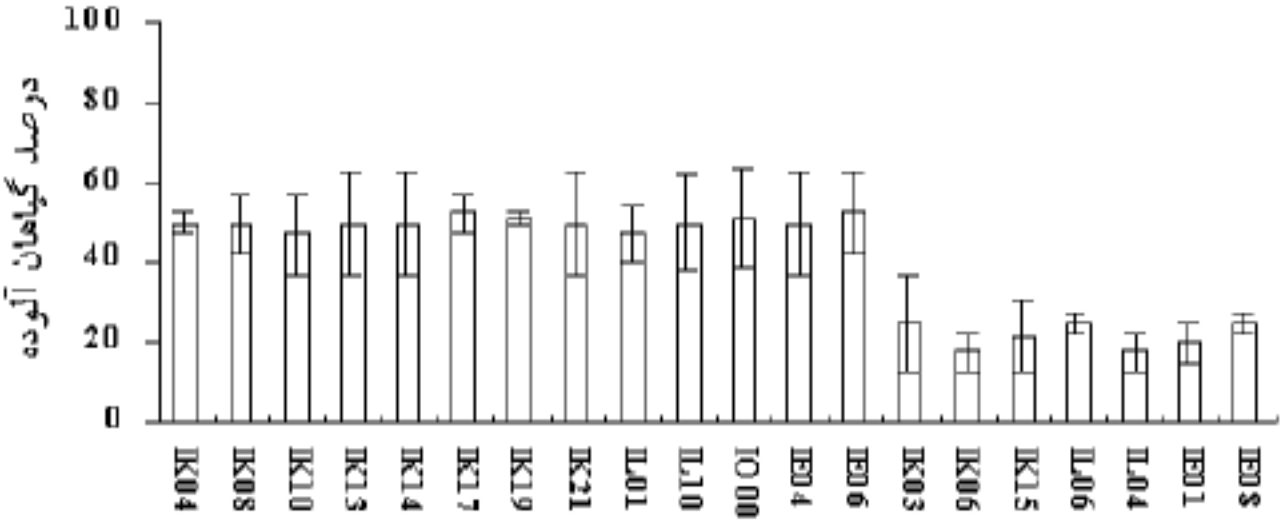
استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی، که به اثر متقابل پاتوژن و میزبان می‌پردازد، یک روش متداول در دسته‌بندی قارچ‌هاست (٢٧). گزارش‌های بسیاری مبنی بر دسته‌بندی جدایه‌های قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده در کشورهای مختلف، از نظر تنوع شدت بیماری‌زایی وجود دارد. جدایه‌های قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از آمریکا بر اساس بررسی شدت بیماری‌زایی تقسیم شده، و ١١ گروه با شدت بیماری‌زایی مختلف معرفی شده است (١٢). فیشر و همکاران (١٠) جدایه‌های قارچ *A. rabiei* متعلق به ایتالیا را از نظر شدت بیماری‌زایی بررسی کرده، آنها را بر این اساس دسته‌بندی کردند. برای نخستین بار،

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای میانگین وزنی آلودگی‌های ایجاد شده در ٤٣ جدایه قارچ *Ascochyta rabiei* در شرایط آزمایشگاهی

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017



شکل ۲. میانگین درصد وزنی آلودگی ریشه نخود توسط جدایه‌های مختلف HV و WV قارچ *Ascochyta rabiei*

در این پژوهش بررسی بیماری‌زایی قارچ *A. rabiei* در شرایط آزمایشگاهی به روش یانگ (۲۸) و دولمانس و همکاران (۹) صورت گرفت. از نتایج حاصل از گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس میانگین میزان آلودگی ایجاد شده، می‌توان جدایه‌های قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران را در سه گروه متفاوت از نظر شدت بیماری‌زایی دسته‌بندی کرد.

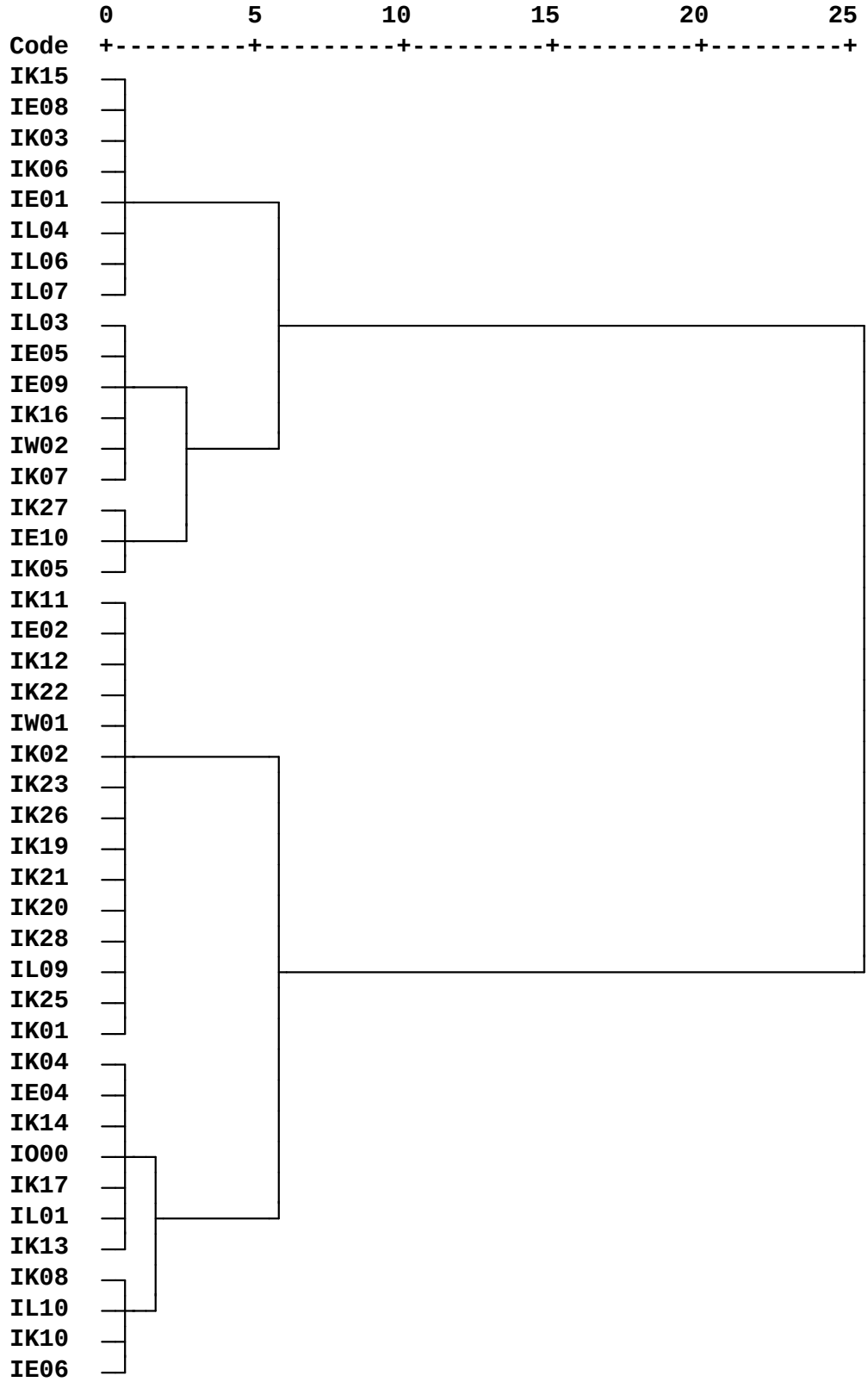
یکی از عوامل مهم در بیماری‌زایی قارچ‌ها، آنزیم‌های پکتیکی است، که با تجزیه ترکیبات پکتینی دیوارهٔ سلولی میزبان، نخستین مراحل آلودگی را فراهم می‌سازند. بنابراین، بررسی میزان تولید و فعالیت این آنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف قارچ، معیار مناسبی برای دسته‌بندی این جدایه‌هاست (۱٦). اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم‌های پکتینی همچون پلی‌گالاکتوروناز و ... در جدایه‌هایی که در زمان‌های یکسان در محیط کشت مایع رشد یافته‌اند، یک روش معمول آزمایشگاهی است (۲)، و چون تخریب بافت‌های آلوده به *Ascochyta blight* در اثر فعالیت آنزیم‌های پکتینی، به ویژه پلی‌گالاکتورونازهای مترشحه از قارچ *Ascochyta rabiei* گزارش گردیده است (۲٦)، اندازه‌گیری فعالیت پلی‌گالاکتوروناز می‌تواند یکی دیگر از روش‌های سنجش میزان بیماری‌زایی و گروه‌بندی جدایه‌های مختلف *Ascochyta rabiei* باشد.

از ٤۳ جدایه *A. rabiei* مورد بررسی هفت جدایه IL06، IK15، IE08، IK03، IK06، IE01 و IL04 که به عنوان جدایه‌های WV معرفی شده بودند، دارای کمترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (کمتر از سه واحد فعالیت در دقیقه در یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی)، و ۱۱ جدایه IL10، IK10، IE06، IK04، IE04، IK14، IO00، IK17، IL01، IK13 و IK08 که به عنوان جدایه‌های HV معرفی شده بودند، دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونـاز (بیشتر از ۹ واحد فعالیت در دقیقه در میلی‌لیتر) بودند.

مقایسه نتایج مربوط به گروه‌های چهارگانه به دست آمده در این روش با گروه‌های حاصل از آزمایش بیماری‌زایی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ۱۱ جدایه IK13، IK10، IK08، IK04، IE04، IO00، IL10، IL1، IK17، IK14 و IE06 که در گروه IV قرار می‌گیرند، دارای فعالیت آنزیمی بیشتر از ۹ واحد هستند. صد درصد این جدایه‌ها HV بوده و در گروهIII آزمون بیماری‌زایی نیز قرار دارند.

همه جدایه‌های WV (IK03، IK06، IE01، IL04، IL06، IK15 و IK08) دارای فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونازی کمتر از سه واحد هستند. این جدایه‌ها در هر دو گروه‌بندی در دسته‌های جداگانه قرار می‌گیرند (گروه II آزمون بیماری‌زایی و

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017



شکل ۳. دندروگرام حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای فعالیت آنزیم PG ٤٣ جدایه، که با استفاده از تفاوت بین جدایه‌ها به روش UPGMA و با برنامهٔ SPSSWIN رسم گردید

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

گروه I فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز). با توجه به هم‌بستگی میزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف، احتمالاً این آنزیم در بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *A. rabiei* نقش دارد. این یافته با گزارش‌های ارائه شده در زمینهٔ اهمیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در جدایه‌های بیماری‌زای قارچ *Rhizoctonia solani* (۳۲) و *Fusarium oxysporum* (۳۳) هم‌خوانی دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش در چارچوب یک طرح ملی با حمایت شورای پژوهش‌های علمی کشور انجام یافته است، که بدین وسیله صمیمانه تشکر می‌گردد. از آقای مهندس حسن یونسی کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه، به خاطر اهدای تعدادی از جدایه‌های قارچ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱ . اخوت، م. (۱۳۵۷). مطالعه در مورد چند روش مبارزه علیه قارچ *Ascochyta rabiei* عامل برق زدگی نخود ایرانی. علوم کشاورزی ایران، ۲(٤): ۷-۱٦.

2. Alana, A., I. Alkorta and J. B. Dominguez. 1990. Pectinlyase activity in a *Penicillium italicum* Strain. Appl. and Environ. Microbiol. 56: 3755-3759.
3. Bouzand, Z., R. Corbiere, A. Elbiari and D. Spire. 1997. Protein and isozyme analysis of *Ascochyta* species of food legumes using the isoelectric focusing method. PP. 49-66. *In:* S. M. Udupa and F. Weigand (Eds.), Application of DNA fingerprinting for crop important marker-assissted selection of chick-pea for sustainable agriculture in the dry areas, 11-12 April, 1994, ICARDA, Aleppo, Syria.
4. Collmer, A. 1987. Pectic enzyme and bacterial invasion of plants. PP. 329-335. *In*: Plant-microbe Interaction. Molecular and Genetic Perspectives. Macmillan, New York.
5. Cooper, R. M. 1983. The mechanisms and significance of enzyme degradation of host cell walls by parasites. Biochemi. Plant Pathol. 100-105.
6. Diekmann, M. 1992. Use of climatic parameter to predict the global distribution of *Ascochyta blight* on chickpea. Plant Dis. 76: 409-412.
7. Di-Pietro, A. and M. I. G. Roncero. 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : purification, characterization, and production during infection on tomato plants. Phytopathol. 86: 1324-1330.
8. Di-Pietro, A. and M. I. G. Roncero. 1998. Cloning, experssion, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum.* Molecular Plant Microbe Interactions 11: 91-98.
9. Dullemans, A., M. G. Korsman, P. M. Houterman and J. Keijer. 1995. *In vitro* analysis of infection specificity of *Rhizoctonia solani*, International Symposium of Rhizoctonia, The Netherlands.
10. Fischer, C., A. Porta-Puglia and W. Barz. 1995. RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. J. Phytopathol. 143: 601-607.
11. Gowen, S. R., M. Orton, B. Thurely and A. White. 1989. Variation in pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on chickpea. Trop. Pest Manage. 35: 180-186.
12. Jan, H. and M. V. Wiese. 1991. Virulences forms of *Ascochyta rabiei* affecting in the palouose. Plant Dis. 75: 904-906.
13. Kaiser, W. J. and M. Okhovat. 1966. Distribution of *Didymella rabiei,* the teleomorph of *Ascochyta rabiei* in Iran. Iran. J. Plant Pathol. 32: 158-162.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 11:16 IRDT on Thursday September 21st 2017

14. Kusmenoglu, I., F. J. Muehlbauer and K. Kazan. 1992. Inheritance of isozyme variation in *Ascochyta blight* - resistant chickpea lines. Crop Sci. 32(1): 121-127.
15. Maden, S., D. Mathur and S. B. Neergaard. 1975. Detection and location of seed born inoulum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). Seed Sci. Technol. 3: 667-681.
16. Mikes, O., J. Sedlackkova and L. Roxava-Benkova. 1981. High Performance Liquid Chromatography of pectic enzyme. J. Chromatog. 207: 99-114.
17. Miyairi, H., J. Magata, E. Takeda, T. Okuno and K. Sawai. 1994. Purification and properties of pectinolytic enzyme produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae.* Bulletin of the Faculty of Agriculture, HirOsaki Univ. 20: 1-18.
18. Mmbaga, M. T. 1997. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and *Ascochyta blight* resistance in chickpea. PP. 23-37. *In:* Application of DNA Fingerprinting for Crop Important Marker- assissted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas, 11-12 April 1994, ICARDA, Aleppo, Syria.
19. Nene, Y. L. and M. V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control of *Ascochyta blight* in chickpea. PP. 233-270. *In:* M. C. Saxena and K. B. Singh (Eds.), The Chickpea. CAB International Oxon, UK.
20. Patino, B., M. L. Posada, M. T. Gonzalez-Jaen and C. Vazquez. 1997. The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici.* Microbios 91: 47-54.
21. Petrini, O. and G. B. Ouellette. 1994. Hose Wall Alterations by Parasitic Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
22. Schafer, W. 1994. Molecular mechanism of fungal pathogenicity to plants. Ann. Rev. Phytopathol. 32: 461-477.
23. Seewtingham, M. W., R. H. Cruickshank and D. H. Wong. 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the ceratobasidiaceae. Trans. British Mycol. Soc. 86: 305-311.
24. Singh, K. B. 1997. Experience with pyramiding of *Ascochyta blight* resistance genes in Kabuli chickpea. PP. 121-126. *In:* S. M. Udupa and F. Weigand (Eds.), DNA Markers and Breeding for Resistance to *Ascochyta blight* in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.
25. Singh, K. B., G. C. Hawtin, Y. L. Nene and M. V. Reddy. 1981. Resistance in chickpea to *Ascochyta rabiei*. Plant Disease 65: 586-587.
26. Thenhaken, R. and W. Barz. 1991. Characterization of pectic enzymes from the chick-pea pathogen *Ascochyta rabiei*. Z. Naturforsch. 46C: 51-57.
27. Wies, M. V., W. J. Kaiser, L. J. Smith and F. J. Muehlbauer. 1996. *Ascochyta blight* of Chickpea. Commun. Center, Univ. Idaho.
28. Yang, H. 1993. Genetic studies on strains of *Rhizoctonia solani* associated with bare patch disease of cereal in western Australia. Univ. Western Australia.
29. Younessi, H., M. Okhovat, Gh. Hedjaroude, M. R. Zamani and M. Motallebi. 1999. Variability in virulence of *Ascochyta rabiei* on chickpeas in Kermanshah province, The 8th Iran. Biol. Conf., 31 Aug.-2 Sep., Kermanshah, Iran.
30. Younessi, H., M. Okhovat and M. R. Zamani. 1998. Study of chickpea blight in Kermanshah province. Proc. 13th Iran. Plant Protec. Cong., Karaj, Iran.
31. Zalpoor, N. 1963. *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. (*Mycosphaerella rabiei* Kovachevski). Ent. Phytopathol. Appl. 21: 10-12.
32. Zamani, M. R., M. Motallebi and M. A. Arefpour. 2000. Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of *Fusarium oxysporum*. Iran. J. Agric. Sci. 31: 293-302.
33. Zamani, M. R. 1995. The pectic enzymes of *Rhizoctonia solani* AG-8 strains. Ph.D. Thesis, School of Biol. and Environ. Sci., Murdoch Univ., Australia.