

بررسی تفاوت بیماری زایی پاتوتیپ‌های ۴ و ۶ قارچ *A. rabiei* عامل بیماری برق‌زدگی نخود

امیر دریابی، ماهرخ فلاحتی رستگار و بهروز جعفری‌پور^۱

چکیده

تفاوت بیماری زایی پاتوتیپ‌های ۴ و ۶ قارچ *A. rabiei*، عامل بیماری برق‌زدگی نخود از جنبه‌های ماهیت بیوشیمیایی گیاه و ترکیب ژنومی پاتوتیپ‌ها در چهار بخش بررسی گردید: (الف) تعیین شمار ژن‌های پایداری در هیجده رقم بومی نخود، (ب) مقایسه تغییرات غلظت الکتروولیت‌های سدیم و پتاسیم در ساقه گیاه‌چه‌های نخود آلوده و سالم ارقام حساس و پایدار، (ج) بررسی تأثیر تنفس نبود پتابسیم در محیط غذایی هوگلند برای پنج رقم افتراقی نخود، (د) امکان دیدن تفاوت‌های ژنومی دو پاتوتیپ با روش RAPD-PCR مشاهده می‌گشین ۹ ژن اصلی پایداری در رقم بومی ۱۴۴-۱-۶۵-۱ از کل ده ژن تعیین شده پایداری به بیماری برق‌زدگی طبق روش ونرین و هاوار (۱۹۹۷)، نشان دهنده غنی بودن این رقم از لحاظ ژن‌های پایداری، و امکان استفاده از آن در کارهای بهزیادی است. در حالی که ارقام دیگر نسبتاً متتحمل تا کاملاً حساس بوده و ژن‌های پایداری اندکی داشته‌اند. کاهش شدید غلظت الکتروولیت‌ها در رقم حساس ILC1929 در مقایسه با رقم پایدار ILC5928 نشان دهنده وجود سازگاری میان بیمارگر و گیاه میزان است، افزایش پایداری ارقام افتراقی در نتیجه تنفس نبود پتابسیم، گویای القای پایداری اکتسابی در تولید پیوترسین، و به دنبال آن بهبود ساختارهای دفاعی می‌باشد، و نهایتاً تشابه ۸۰ درصدی باندهای ژنومی پاتوتیپ‌ها با استفاده از مارکر CG و آغازگر ۱۷۱، نشان دهنده ناکافی بودن شمار آغازگر و لزوم به کارگیری روش‌های تکمیلی است.

واژه‌های کلیدی: برق‌زدگی نخود، پاتوتیپ، پایداری اکتسابی، پیوترسین

مقدمه

تاكنون ۵۰ بیماری در نخود از سراسر جهان شناسایی شده، که از آن به ۱۰۰ درصد می‌رسد (۹). *Didymella* قارچ عامل بیماری در مرحله جنسی با نام *rabiei* (Kovachevski) Von Arx. سودوتیسیوم، که برای تولید مثل به دو پایه سازگار ۱-۱ و MAT1-1 گزارش گردیده، و در سال‌های همه‌گیری بیماری خسارت ناشی

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

افوایش یافت. کاورت و همکاران (۴) گزارش کرده‌اند که یکی از دلایل از دست رفتن پایداری نخود نسبت به بیمارگرها تولید نکردن فیتوآلکسین، به خاطر تأثیر ژن‌های سم‌زا از جانب بیمارگر است. آنها در بررسی قارچ *Nectria haematococca* متوجه شدند که این قارچ دارای چهار ژن MAK₁ تا MAK₄ است، که قادر به تجزیه فیتوآلکسین ماکیان نخود می‌باشد.

PCR-RAPD آدوپا و ویگاند (۱۰) با استفاده از روش *A. faba f.sp. rabiei* از سوریه را با گونه *A. lantis* مقایسه نمودند، که باندهای حاصل تفاوت این دو گونه را نشان می‌داد، در حالی که در بررسی‌های ظاهربی تمايز این دو گونه به سختی امکان‌پذیر است. هم‌چنین، این دو با استفاده از آغازگر₄ (GATA) توانستند ژنتوتیپ‌های قارچ مذکور و فراوانی آنها را در سوریه به دست آورند. وايزينگ و همکاران (۱۲) دریافتند که توالی‌های الگونوکلئوتید مکمل ريزماهواره‌ها می‌توانند به طور مؤثری به عنوان آغازگر در روش RFLP، برای تعیین اختلاف ژنتیکی جدایه‌های *A. rabiei* مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

در یک بررسی در جدایه‌های قارچ *A. rabiei* از برخی نقاط استان‌های کردستان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خراسان و ایلام، دو پاتوتیپ با شماره‌های ۴ و ۶، طبق روش ایکاردا توسط نوراللهی و همکاران (۱) به دست آمد، که با استفاده از این پاتوتیپ‌ها آزمایش‌های زیر صورت گرفت.

بررسی‌های آزمایشگاهی

تهیه سوسپانسیون اسپور پس از رشد پاتوتیپ‌ها به مدت ۲۱ روز روی محیط کشت PDA، با خراشیدن سطح آن و اضافه کردن آب مقطر سترون و عبور آن از پارچه ململ چهار لام، سوسپانسیون اسپوری با غلظت 2×10^5 اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر

MAT۱-۲ نیاز دارد (۶). قارچ عامل بیماری به صورت بذریزد، هوازد یا روی بقایای آلوده گیاهی به گیاه سالم منتقل شده و آلودگی را گسترش می‌دهد. و نرینن و هاوار (۱۱) با تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از گرینش ارقام نخود در نقاط مختلف، با آزمایش گلخانه‌ای در رقم ۴۸-۵۷۶ ۱-۰ نخود نتیجه گرفتند که توارث پایداری به بیماری برق‌زدگی کمی است. آنها از مشاهده افت محصول در ارقامی مانند C_{۱۲/۳۴}، C_{۲۳۵}، C_{۷۲۷} و CM_{۷۲} نتیجه گرفتند که ده ژن اصلی و مستقل در بروز پایداری یا حساسیت دخالت دارد (۱۱). با توجه به این که معمولاً خسارت ناشی از بیماری برق‌زدگی نخود در یک مقیاس ۱ تا ۹ سنجدیده می‌شود، که در آن بدون علامت برابر ۱، و گیاه مرده برابر ۹ می‌باشد (۶)، هر آلل درجهٔ پایداری به بیماری را تا ۴/۰ کاهش می‌دهد، و در جایی که همه آلل‌های پایداری حضور دارند (۲۰×۰/۴=۸)، درجهٔ بیماری (۹-۸=۱) مساوی ۱، و در صورت حضور تنها آلل‌های حساسیت (۴=۸/۲۰×۰)، درجهٔ بیماری (۸+۱=۹) مساوی ۹ است (۱۱).

فلورز (۵) به طور مصنوعی، با کاهش یون پتاسیم در محیط غذایی جو توانست غلظت پیوترسین را افزایش دهد. اسکالت و همکاران (۸) دریافتند که افزایش فعالیت پراکسیدازها و دی‌آمین اکسیدازها در گیاه زخمی نخود، مرتبط با فرایندهای سوپره شدن و لیگنینی شدن سلول‌های مجاور سلول‌های زخمی است. آنجلینی و همکاران (۳) نشان دادند که پایداری نخود به قارچ *A. rabiei* در ارقام پایدار نسبت به ارقام حساس، مربوط به مقادیر زیاد دی‌آمین اکسیداز است. اسکالت و همکاران (۸) نیز دریافتند که در هنگام آلودگی لایه محافظ در ارقام پایدار بسیار ضخیم‌تر و گسترده‌تر از ارقام حساس است.

پالوان اونسال (منتشر نشده) با بررسی تأثیر تنفس فقدان پتاسیم در محیط غذایی نخود در تولید آنزیم‌های دی‌آمین اکسیداز و دی‌آمین پراکسیداز، دریافت که در اثر کاهش پتاسیم میزان فعالیت این آنزیم‌ها در جوانه تا هشت برابر افزایش داشت، در حالی که در برگ‌ها و ریشه‌ها به ترتیب ۲۵ و ۹ درصد

تهیه گردید (۹).

جدول ۱. اجزای مورد نیاز برای RAPD-PCR

مواد	مواد	غلظت	حجم (μ)
ddH ₂ O	-	-	۳۷
PCR Buffer	۱۰X	۱۰	۵
MgCl _۲	۵۰ mM	۵۰	۲
dNTP	۱۰ mM	۱۰	۲
Primer	۶۰ ng	۱/۵	۱/۵
DNA template	۲۰ ng	۱/۵	۱/۵
Taq. Poly	۵U/ μ l	۱	۱
مجموع		۵۰	

تعیین میزان تشابه باندها

به منظور بررسی میزان تشابه ژنتیکی پاتوتیپ‌ها از اندازه مهاجرت‌های باندی نمونه‌ها بر مبنای ضریب تشابه فنی استفاده شد (۷).

$$Nei = \frac{2 \times N_{(1,1)}}{N_{(1,1)} + N_{(0,1)}}$$

$N_{(1,1)}$ = تعداد مقایساتی که هر دو نمونه نمره یک دارند.

$N_{(1,0)}$ = تعداد مقایساتی که نمونه اول نمره یک و نمونه دوم نمره صفر دارد.

$N_{(0,1)}$ = تعداد مقایساتی که نمونه اول نمره صفر و نمونه دوم نمره یک دارد.

بررسی گلخانه‌ای

روش‌های ثبت عالیم، واکنش‌ها و شدت بیماری زایی در این بررسی‌ها ثبت درجه واکنش بر پایه مقیاس ۱ تا ۹ جان و وایز (۶) که ۱ به عنوان بدون علامت و درجات ۲ تا ۹ به صورت لکه‌های گرد تا کشیده و همراه با ریزش برگ و شکستگی ساقه، و تهایتاً مرگ کامل گیاه است در نظر گرفته شد. در تقسیم‌بندی واکنش پایداری ارقام طبق تقسیم‌بندی ردی و نن (۱۹۷۹)، درجات ۱ تا ۴ به عنوان پایدار، درجات ۴/۱ تا ۶ به عنوان متتحمل، و درجات ۱/۶ تا ۹ به عنوان حساس می‌باشند. سرانجام، شدت بیماری زایی پاتوتیپ‌ها با استفاده از مقیاس

اندازه گیری غلظت یون‌های پتاسیم و سدیم در ساقه نخود در مراحل گوناگون رشد نخود، از روز دهم هر سه روز یک بار تا روز بیست و یکم، از ساقه‌های نخود آلوده و سالم در رقم حساس (ILC1۹۲۹) و پایدار (ILC۵۹۲۸) تکه‌هایی جدا شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای محاسبه میزان عناصر موجود در بافت‌های گیاهی، نخست مقداری از اندام و بافت مربوط در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. سپس یک گرم از آن جدا گردید، و در ظروف چینی درون کوره الکتریکی با دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار داده شد تا خاکستر آن به دست آمد. به منظور هضم خاکستر به دست آمده، ابتدا از اسید نیتریک ۸۵٪ به میزان ۲۰ میلی‌لیتر و سپس اسید پرکلریک ۷۲٪ به میزان ۱۰ میلی‌لیتر استفاده گردید. در هر مرحله به طور مرتب محلول به هم زده شد تا محلولی یکرنگ و بدون رسوب حاصل گردید. سپس با گرم کردن محلول و بهم زدن آن حدود سه میلی‌لیتر از محلول باقی ماند. پس از انجام این مراحل، نمونه‌ها در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شدند (۲).

برای کالیبره کردن دستگاه از محلول خالص پتاسیم و سدیم با غلظت ۵۰ ppm استفاده شد. سپس هر یک از محلول‌های به دست آمده در مراحل مختلف رشدی گیاه به بخش مکنده دستگاه فلیم فتوомتر متصل گردید و عدد نمایش‌دهنده دستگاه یادداشت شد. پس از هر بار اندازه گیری توسط آب مقطر، مسیر عبور محلول‌ها در دستگاه شسته شو شد (۲).

روش PCR

استخراج شده از میسلیوم دو پاتوتیپ و یک نمونه شاهد از جدایه‌های کمانشاه، با غلظت مناسب ۵۰۰-۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، طبق روش مولیس و همکاران (۷)، به همراه مواد جدول ۱ در دستگاه PCR قرار گرفت.

جدول ۲. مشخصات ۱۸ رقم نخود بومی

ردیف	مبدأ	شماره رقم
۱	مشهد	۱۸-۶۷-۱۸۰
۲	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۶
۳	اردبیل	۱-۶۰-۴۲۰
۴	مشهد	۱۸-۶۹-۸۷
۵	ایکاردا- ایران	ILC۸۵
۶	شیراز	۱۲-۶۰-۳۱
۷	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۱۰
۸	اردبیل	۱-۶۰-۲۲۴
۹	شیراز	۱۲-۶۰-۱۱
۱۰	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۱
۱۱	ایکاردا- ایران	ILC۱۱۷۵
۱۲	مشهد	۱۸-۵۴-۱۵۷
۱۳	اردبیل	۱-۶۰-۲۱۹
۱۴	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۶۴
۱۵	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۵
۱۶	شیراز	۱۲-۰۷۱-۱۰۱۰۵
۱۷	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۴
۱۸	شیراز	۱۲-۰۷۱-۱۰۰۰۴

جان و وایز، که در آن تیپ‌های آلوگی ۱ تا ۹ نشان دهنده شدت بیماری زایی کم و درجات ۶ تا ۹ نشان دهنده شدت بیماری زایی زیاد است تعیین گردید (۹).

بررسی واکنش ارقام در گلخانه هجده رقم بذر نخود از سوی مؤسسه نهال و بذر با مشخصات مندرج در جدول ۲، به طور جداگانه با محلول قارچ‌کش بنومیل پنج درصد آغشته، و پس از خشک کردن بذرها در هوای آزاد، به تعداد پنج عدد در هر گلدان با قطر دهانه ۱۵ سانتی متر حاوی خاک، ماسه و خاک برگ به نسبت ۱:۱:۳ در سه تکرار و عمق ۲/۵ سانتی متر کشت گردید.

مايه زني قارچ عامل بيماري در مرحله گياهچه‌اي گياهچه‌های ۱۵ روزه نخود زير پوشش پلاستيكي با دماي ۱۹ تا ۲۵ درجه سانتي‌گراد و رطوبت نسبتي ۹۵ تا ۹۰ درصد، با سوسپانسيون اسپور هر يك از پاتوتاپ‌ها به ميزان دو ميلی‌لิتر برای هر گلدان اسپورپاشی شدند. پس از يك هفته، با برداشت پوشش، يادداشت برداري عاليم در طي دو هفته انجام گرفت (۹). برای از بين بردن کشش سطحی آب و جلوگيري از رسوب قطرات آب به هنگام اسپورپاشی، از دترژنت توين به ميزان يك قطره در ۱۰۰ ميلی‌لิتر سوسپانسيون اسپور، و نيز قرار دادن گياهان مائيه زني شده به مدت ۲۴ ساعت خارج از پوشش پلاستيكي، به منظور کاهش رطوبت و جلوگيري از سقوط قطرات سوسپانسيون اسپور واقع بر گياه استفاده شد.

مايه زني قارچ عامل بيماري در مرحله بلوغ گياهان دارای غلاف مانند مرحله گياهچه‌اي اسپورپاشی شدند، و مراحل يادداشت برداري عاليم نيز همچون روش قبل صورت گرفت.

بررسی تأثیر تنفس نبود پتابسیم در محیط غذایی نخود به منظور بررسی تأثیر تنفس نبود پتابسیم در محیط غذایی نخود،

از پنج رقم افتراقی نخود: ILC۱۹۲۹، ILC۲۵۰۶، ILC۵۹۲۸، ILC۳۲۷۹ و ILC۷۲ در محیط مایع غذایی هوگلند استفاده شد. برای حذف پتابسیم از محیط غذایی، به جای KNO_3 از NH_4NO_3 به ميزان ۴۰۰ ميلی‌گرم در لิتر، و نيز به جای NaH_2PO_4 از KH_2PO_4 به ميزان ۱۵۶ ميلی‌گرم در لิتر استفاده شد، ولی برای ارقام شاهد اين حذف صورت نگرفت.

بذور پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه و شستشو در آب مقطر سترون به منظور تسريع در جوانه‌زنی، در پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب سترون قرار گرفتند. سپس در گلدان‌های حاوی شن و پرليت به نسبت ۴:۱ کاشته شدند، و آبياري با استفاده از اين محیط غذایي در مقاطع

پس از مدتی متوقف می‌گردد، بررسی فوق تنها در مرحله گیاهچه‌ای در پنج رقم افتراقی یاد شده انجام گرفت، و در نوع واکنش پایداری این ارقام در تیمارهای دارای پتابسیم و بدون آن تغییری دیده نشد. ولی از لحاظ درجه واکنش ارقام در حدود ۲-۱ درجه از مقیاس ۱ تا ۹ ردی و نن (۱۹۷۹) در جهت بهبود پایداری کاهش نشان دادند (جدول ۷).

بحث

در برهمکنش بیمارگر-گیاه میزبان، گذشته از تأثیر عوامل محیطی، نقش ماهیت ژنتیکی گیاه میزبان یا بیمارگر، هر یک در بروز یا عدم بروز بیماری مؤثر است. بنابراین، می‌توان برهمکنش به وجود آمده را در دو بخش (الف) ماهیت ژنتیکی گیاه میزبان، و (ب) ماهیت ژنتیکی بیمارگر بررسی نمود.

الف) ماهیت ژنتیکی گیاه میزبان

فراورده‌های ژنومی گیاه میزبان با تأثیرگذاری در فعالیت‌های دفاعی مانع نفوذ یا گسترش بیمارگر در درون یا روی بافت‌ها می‌شوند، و در این میان ژن‌های مقاومت نقش اصلی را ایفا می‌کنند. طبق آخرین یافته‌ها در توارث پایداری نخود نسبت به بیماری برق‌زدگی توسط وزرین و هاوار (۱۱)، ده ژن اصلی و مستقل در بروز پایداری و حساسیت دخالت دارند. این موضوع در واکنش ارقام افتراقی و بومی نسبت به پاتوتیپ‌های ۴ و ۶ نیز قابل بررسی است. اگر هر آلل پایدار به میزان ۴/۰ کاهش بیماری را بهبود بخشد، در نتیجه تأثیر ۹ ژن مستقل پایداری، درجه واکنش به میزان ۸ درجه از مقیاس ۹-۱ ردی و نن کاسته می‌شود. در نتیجه درجه واکنش برابر با ۱ (مصنونیت) خواهد بود، و بر عکس با وجود ۹ ژن مستقل حساسیت، با افزایش ۸ درجه در مقیاس فوق (۹=۱+۸) حساسیت کامل (مرگ گیاه) به وجود خواهد آمد. در رقم افتراقی و پایدار ILC5928 درجه واکنش ۲ نشان دهنده کاهش درجه واکنش بیماری به میزان ۷ درجه است (۴/۰÷۷) که به طور میانگین ۱۸ آلل پایداری را شامل می‌شود. بنابراین، در بروز پایداری این رقم، ۹ ژن اصلی و

زمانی مناسب انجام گردید. مایهزنی قارچ عامل بیماری و یادداشت برداری علاوه مانند روش‌های ذکر شده پیشین صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی

بررسی ژنومی پاتوتیپ‌ها

سه نمونه مورد آزمایش در روش RAPD-PCR، در باندهای ۳۱۵، ۳۶۸، ۳۱۲ و ۱۴۱ هیچ گونه باندی ندادند (شکل ۱)، و در بررسی تشابهات باندی، با استفاده از ضربی تشابه ثئی دو نمونه از نظر آغازگر ۱۷۱ تا میزان ۸۰ درصد به یکدیگر شبیه بودند (جدوال ۴ و ۵).

اندازه‌گیری میزان یون‌های پتابسیم و سدیم

در ارقام مایهزنی نشده شبیب بسیار ضعیفی در میزان یون‌های سدیم و پتابسیم مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳)، در حالی که در ارقام مایهزنی شده این شبیب در ارقام حساس ILC1929 در مقایسه با رقم مقاوم ILC5928 شدیدتر بود (شکل‌های ۴ و ۵).

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

بررسی واکنش ارقام بومی

حساسیت و مقاومت نسبت به پاتوتیپ ۴ به ترتیب در ارقام ۱-۶۰-۱۴۴ و ۱-۶۰-۲۲۴ دیده شد، و ارقام ۱-۶۰-۱۴۶، ۱۲-۶۰-۳۱، ۱۲-۶۰-۱۱، ۱۲-۶۰-۱۰۵ و ۱۲-۰۷۱-۱۰۱۰۵ در مرحله گیاهچه‌ای پایدار و در مرحله بلوغ متحمل شناخته شد، و در دیگر ارقام پایداری یا تحمل در هر دو مرحله مشاهده نگردید (جدول ۶).

بررسی تأثیر نش نبود پتابسیم

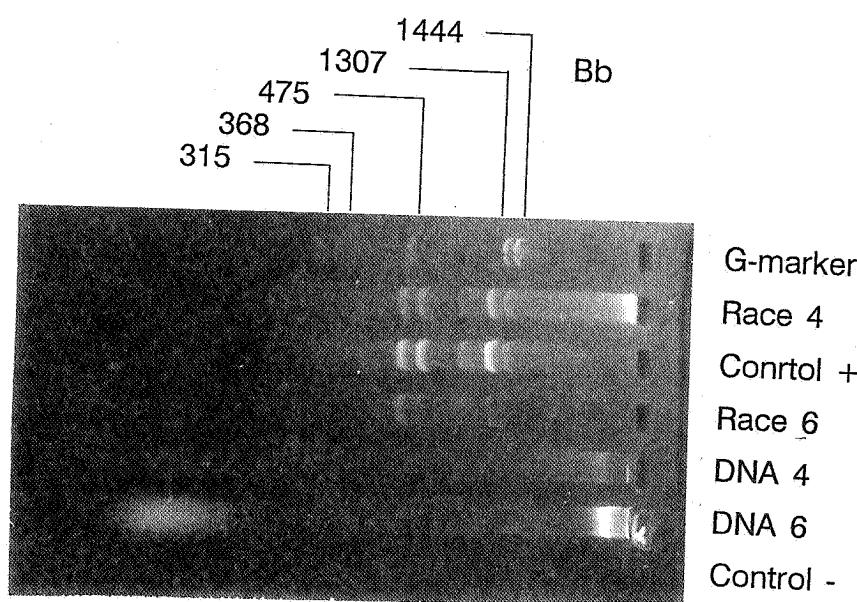
از آن جا که در نتیجه نبود پتابسیم در محیط غذایی رشد گیاه

جدول ۳. ارزیابی میزان مهاجرت باندها در مقایسه با مقادیر ژنومی مارکر CG

bp	CG مارکر	پاتوتیپ ۴	شاهد مثبت	پاتوتیپ ۶
۱۴۴۴	۱۴	-	-	-
۱۳۰۷	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
-	-	۱۷	-	۱۷
-	-	-	۱۸	-
-	-	۱۹	-	-
-	-	-	۲۰	-
-	-	۲۴	۴۴	-
۴۷۵	۲۵	-	-	۲۵
-	-	۲۶	-	-
-	-	-	۲۷	۲۷
۳۶۸	۳۳/۰	-	-	-
۳۱۵	۳۵/۲	-	-	-
۳۱۲	-	-	-	-
۱۴۱	-	-	-	-

جدول ۴. ارزیابی وجود باندها در مقایسه با مارکر CG بر مبنای صفر و یک ضریب تشابه نئی

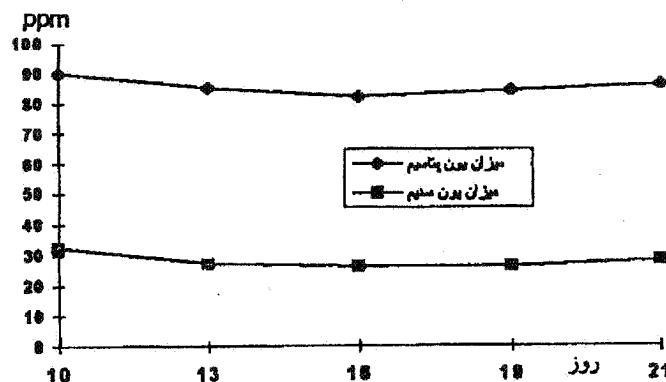
اندازه حرکت باندها بر حسب میلی متر											نمونه ها
۲۷	۲۶	۲۵	۲۴	۲۰	۱۹	۱۸	۱۷	۱۵	۱۰		پاتوتیپ ۴
۰	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱		پاتوتیپ ۶
۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱		شاهد مثبت
۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱		



شکل ۱. باندهای ژنومی پاتوتیپ ها در روش PCR

جدول ۵. ارزیابی تشابه اندازه مهاجرت باندها با استفاده از ضریب تشابه نش

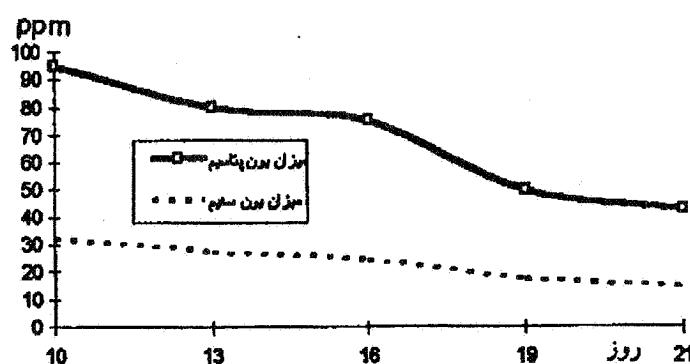
پاتوتیپ‌ها	۶	۴	۰/۸	۰/۶۷	شاهد
۴	۱	۰/۸	۰/۸	۰/۶۷	۰/۶۷
۶	۰/۸	۱	۰/۸	۰/۸	۰/۸
شاهد	۰/۸	۰/۶۷	۰/۸	۰/۶۷	۱



شکل ۲. تغییر غلظت الکتروولیت‌ها در رقم تلقیح نشده و حساس ILC1929



شکل ۳. تغییر غلظت الکتروولیت‌ها در رقم تلقیح نشده و پایدار ILC5928



شکل ۴. تغییر غلظت الکتروولیت‌ها در رقم تلقیح شده و حساس ILC1929

جدول ۶. درجه واکنش و نوع واکنش پایداری ارقام بومی نسبت به پاتوتیپ‌ها در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ

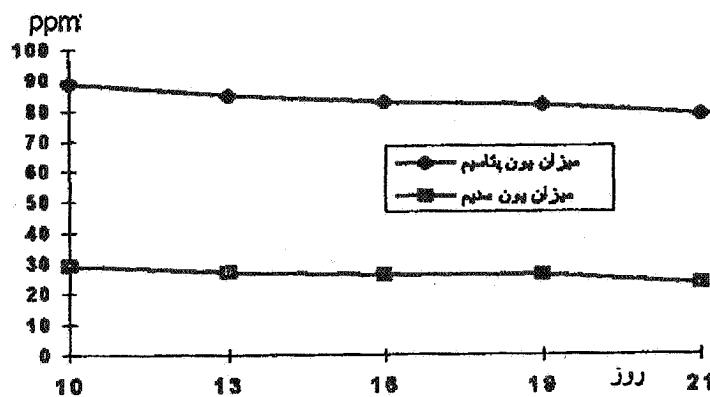
ردیف	خاستگاه	شماره رقم	گیاهچه‌ای		بلوغ		گیاهچه‌ای		بلوغ		گیاهچه‌ای		نسبت به پاتوتیپ ۶
			الف	ب	الف	ب	الف	ب	الف	ب	الف	ب	
۱	مشهد	۱۸-۶۷-۱۸۰	S	۶/۷	T	۴/۷	T	۵/۷	R	۲/۳	۱۸-۶۷-۱۸۰	۱	
۲	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۶	S	۷	T	۵/۷	T	۵/۷	T	۵/۳	۱-۶۰-۱۴۶	۲	
۳	اردبیل	۱-۶۰-۲۲۰	S	۶	S	۸/۳	T	۵/۳	S	۶/۳	۱-۶۰-۲۲۰	۳	
۴	مشهد	۱۸-۶۹-۸۷	S	۷/۷	T	۵/۷	S	۶	R	۴	۱۸-۶۹-۸۷	۴	
۵	ایکاردا	ILC۸۵	S	۶/۳	R	۴	T	۵	T	۴/۷	ILC۸۵	۵	
۶	شیراز	۱۲-۶۰-۳۱	S	۷	S	۶/۷	T	۵/۷	T	۵/۷	۱۲-۶۰-۳۱	۶	
۷	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۱۰	S	۷/۳	T	۴/۷	S	۶/۳	T	۵/۷	۱-۶۰-۱۱۰	۷	
۸	اردبیل	۱-۶۰-۲۲۴	S	۷	S	۸	S	۶/۳	S	۷/۷	۱-۶۰-۲۲۴	۸	
۹	شیراز	۱۲-۶۰-۱۱	S	۶	S	۶/۳	T	۴/۷	T	۴/۷	۱۲-۶۰-۱۱	۹	
۱۰	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۱	S	۶/۳	S	۷	T	۵	S	۸	۱-۶۰-۱۴۱	۱۰	
۱۱	ایکاردا	ILC۱۱۷۵	S	۶/۷	T	۵/۷	T	۵/۷	S	۶/۷	ILC۱۱۷۵	۱۱	
۱۲	مشهد	۱۸-۵۴-۱۵۷	S	۶/۷	S	۶	T	۵/۳	S	۷	۱۸-۵۴-۱۵۷	۱۲	
۱۳	اردبیل	۱-۶۰-۲۱۹	S	۷/۳	T	۵/۳	S	۶/۳	T	۵	۱-۶۰-۲۱۹	۱۳	
۱۴	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۶۴	S	۸	S	۷	S	۷/۳	T	۵/۷	۱-۶۰-۱۶۴	۱۴	
۱۵	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۵	S	۶/۳	S	۷/۳	T	۵/۳	S	۶	۱-۶۰-۱۴۵	۱۵	
۱۶	شیراز	۱۲-۰۷۱-۱۰۱۰۵	S	۶/۳	S	۶/۷	T	۵/۷	T	۵/۷	۱۲-۰۷۱-۱۰۱۰۵	۱۶	
۱۷	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۴	T	۴/۷	R	۳/۷	R	۳/۷	R	۲/۳	۱-۶۰-۱۴۴	۱۷	
۱۸	شیراز	۱۲-۰۷۱-۱۰۰۰۴	S	۶/۳	S	۶/۷	T	۵/۳	R	۳/۷	۱۲-۰۷۱-۱۰۰۰۴	۱۸	

الف: درجه واکنش ب: نوع واکنش پایداری S: حساس R: پایدار

جدول ۷. درجه واکنش و نوع واکنش پایداری ارقام افتراقی نسبت به پاتوتیپ‌ها در برابر تنش پ TASIM

ردیف	شماره رقم	تشن پ TASIM		بدون تنش		تشن پ TASIM		بدون تنش		تشن پ TASIM		نسبت به پاتوتیپ ۶
		الف	ب	الف	ب	الف	ب	الف	ب	الف	ب	
۱	ILC۷۲	S	۶/۷	S	۴/۷	R	۴	R	۳	ILC۷۲	۱	
۲	ILC۱۹۲۹	S	۸/۷	S	۵/۳	S	۶/۷	R	۴/۷	ILC۱۹۲۹	۲	
۳	ILC۲۵۰۶	R	۲/۷	R	۳/۳	R	۲/۳	R	۳/۷	ILC۲۵۰۶	۳	
۴	ILC۳۲۷۹	S	۶	S	۴/۷	R	۳/۷	R	-۳/۷	ILC۳۲۷۹	۴	
۵	ILC۵۹۲۸	R	۲	R	۲/۷	R	۲	R	۳	ILC۵۹۲۸	۵	

الف: درجه واکنش ب: نوع واکنش پایداری S: حساس R: پایدار



شکل ۵. تغییر خلاصت الکتروولیت‌ها در رقم تلقیح شده و پایدار ILC5928

یا تنها شماری از آنها را شناسایی می‌کند. یکی از راه‌های شناخت میزان فعالیت‌های این چنینی، سنجش میزان الکتروولیت‌ها در فضای بین سلولی گیاه در بافت‌هایی است که بیشترین فعالیت بیوشیمیایی را در هنگام رو به رویی با بیمارگر دارند. سنجش میزان یون‌های پتاسیم و سدیم نیز در همین مورد انجام گرفت.

از آن جا که تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی معمولاً نخستین پاسخ آشکار سلول‌های گیاه میزان به عفونت‌های حاصل از عوامل بیماری‌زا، زهراپه‌های اختصاصی و غیر اختصاصی میزان، آنزیم‌های بیمارگر و برخی مواد سمی است، از دست رفتن الکتروولیت‌ها معمول‌ترین نتیجه تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی می‌باشد. با توجه به آسیبی که گیاه حساس، یا به عبارتی سازگار، در برخورد با بیمارگر متحمل می‌شود این تغییرات بیشتر است؛ به طوری که در گیاه حساس ILC1929 شب نزولی میزان الکتروولیت‌ها، به ویژه پتاسیم شدیدتر است، و بنا بر اصل سازگاری بیمارگر-گیاه میزان در مورد گیاهان حساس چنین نتیجه‌ای منطقی به نظر می‌رسد. در گیاه پایدار ILC5928 برهمنکنش به وجود آمده به صورت ناسازگاری است، و شب کاهش الکتروولیت‌ها کمتر از رقم قبلی است. در گیاه سالم نیز با توجه به میزان زیاد فعالیت‌های متابولیسمی در مرحله گیاهچه‌ای، میزان این یون‌ها زیاد بوده، و با گذشت زمان تغییر مختص‌صری در کاهش این یون‌ها دیده

مستقل دخالت دارند. وجود چنین پایداری در برابر پاتوتیپ ۶، که تاکنون رقم کاملاً پایداری در برابر آن شناخته نشده است، نشان دهنده پایداری زیاد این رقم است، و بر عکس در رقم حساس ILC1929، درجه واکنش $7/8$ نشان دهنده افزایش $7/8$ در درجه واکنش است ($19/5 = 7/8 \div 0/4$)، که به طور میانگین ۲۰ آلل حساسیت را شامل می‌شود.

در بررسی پایداری ارقام بومی، در رقم پایدار ۱۴۴-۱۶۰-۱۶۵ در مرحله گیاهچه‌ای و بلوغ نسبت به پاتوتیپ‌های ۴ و ۶ پایداری نسبتاً خوب تا زیادی را بروز داد، می‌توان برای بهترین درجه واکنش آن، یعنی $2/3$ ، به طور میانگین $16/75$ آلل پایداری، یا حدوداً ۹ ژن اصلی را در نظر گرفت. این رقم در بدترین وضعیت نسبت به پاتوتیپ ۶ در مرحله بلوغ، با درجه واکنش $4/7$ ، وجود تعداد میانگین پنج ژن اصلی را نشان می‌دهد. آنچه در این جا قابل توجه است، گزینش یا حذف شماری از این ارقام برای کشت در مناطق نخودکاری است. چون این ارقام سال‌ها در آن مناطق کشت شده‌اند و با بسیاری از عوامل محیطی سازگاری دارند، می‌توان در غنی کردن ژن‌های پایدار به وسیله تلاقی آنها، به ویژه ارقام دارای تحمل، با گیاهان دارای ژن‌های مشخص پایداری اقدام نمود.

مکانیسم‌های مربوط به پایداری هنگامی فعال می‌گردند که گیاه میزان قادر به شناسایی بیمارگر باشد. در غیر این صورت، یا قادر به شناسایی هیچ یک از فراورده‌های ژنی بیمارگر نیست،

ناشی از ضعف نسبی گیاه در تنفس ناشی از نبود پتابسیم باشد.

می‌شود.

ب) ماهیت ژنتیکی بیمارگر ختنی‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه میزبان نتیجه وجود ژن‌های گوناگون بیماری‌زاوی است. کاورت و همکاران (۴) چهار ژن MAK را به عنوان ژن‌های مؤثر در تجزیه فیتوآلکسین ماسکیان‌نخود معرفی کردند. بنابراین، بایستی برای دیگر فیتوآلکسین‌های نخود ژن‌های دیگری را در نظر گرفت. شکست پایداری ارقام نخود در رو به رویی با پاتوتیپ‌های مهاجم قارچ عامل بیماری، این احتمال را قوت می‌بخشد که پاتوتیپ مهاجم ۶ دارای بیشترین ژن‌های یاد شده است. این امر، و ویژگی‌های دیگر بیماری‌زاوی بیمارگر می‌توانند سبب تفاوت ژنومی پاتوتیپ‌ها از یکدیگر باشند. هر چند که در بررسی ژنومی پاتوتیپ‌های ۴ و ۶ به خاطر شمار کم آغازگرها تفاوت چشمگیری دیده نشد، ولی با بهره‌گیری از روش‌های کارآمدتر، همچون انگشت‌نگاری با توالی‌های ۳-۸ نوکلئوتیدی و RFLP، می‌توان ژنوتیپ‌های بسیاری را در میان جدایه‌های مناطق گوناگون به دست آورد، که شناسایی پاتوتیپ‌ها را دقیق‌تر می‌نماید.

در بررسی پایداری ارقام افتراقی با استفاده از محیط غذایی هوگلند، نبود پتابسیم موجب تحریک گیاه به تولید پیوتروسین می‌گردد، و نتیجه آن به صورت آغاز یک رشته فعالیت سلولی در گیاه و تقویت سدهای دفاعی و محدود کننده، پس از حمله بیمارگر است. در نتیجه کاهش یون پتابسیم، مقدار پیوتروسین و فعالیت دی‌آمین اکسیداز افزایش می‌یابد. هر دو این ترکیبات در محافظت گیاه به هنگام تنفس نقش دارند. هر چند مسئله شناسایی بیمارگر برای گیاه اهمیت دارد، ولی در اینجا در نتیجه کاهش پتابسیم، گونه‌ای از مکانیسم‌های دفاعی فعال می‌شود که پاسخ طبیعی گیاه به آسیب‌های محیطی مانند ایجاد زخم ناشی از انهدام سلول‌های گیاه توسط بیمارگر است، که موجب آغاز یک دسته فعالیت نظیر ساخت بافت چوب‌بنه و ترشح لیگنین در اطراف محل آسیب دیده می‌گردد.

همان طوری که از نتایج آزمایش برمری آید، هر یک از ارقام با کاهش حدود ۲-۱ درجه از مقیاس ۱ تا ۹ ردی و نن در بهبود پایداری پیشرفت داشتند. هر چند که در تقسیم‌بندی واکنش‌ها، ارقام شاهد حساس در دسته ارقام پایدار قرار نگرفتند، ولی در سطح مزرعه، این بهبود در وضعیت گیاه، کاهش کمتر محصول را به هنگام آلدگی به همراه دارد. لازم به یادآوری است که کاهش پایداری رقم پایدار ILC5928 از درجه ۲ به ۳، می‌تواند

منابع مورد استفاده

۱. نوراللهی، ح.، م. فلاحتی رستگار و ب. جعفری‌پور. ۱۹۷۹. تشخیص نژادهای فیزوپولوژیک *A. rabiei*. عامل بیماری برق‌زدگی نخود در چند منطقه ایران. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴(۱): ۱۲۷-۱۳۶.
2. Allison, L. E., L. Bernstein and J. W. Brown. 1969. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. Agric. Handbook No. 60, U. S. Dept. of Agriculture.
3. Angelini, R., M. Bragaloni, R. I. Federico, A. Infantino and A. Porta-Puglia. 1993. Involvement of polyamines diamine oxidase and peroxidase in resistance of the chickpea to *A. rabiei*. J. Plant Physiol. 142(6): 704-709.
4. Covert, S. F., J. Enkerli, V. P. W. Miao and H. D. Van Etten. 1996. A gene for maackiain detoxification from a dispensable chromosome of *Necteria haemotococca*. Molecular and General Genet. 215(4): 397-406.
5. Flores, H. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. PP. 213-228. In: R. D.

- Slocum and H. E. Flores (Eds.), Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. CRC Press, London.
6. Jan, H. and M. V. Wiese. 1991. Virulence forms of *A. rabiei* affecting chickpea in the Palouse. Plant Dis. 75: 904-906.
 7. Mullis, K. B. 1985. Enzymatic amplification of beta-plobin genomic sequences and restriction-site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. Sci. 230: 1350-1354.
 8. Scalet, M., R. Federico and R. Angelini. 1991. Time course of diamine oxidase and peroxidase activities and polyamine changes after mechanical injury of chickpea seedlings. J. Plant Physiol. Veg. 137: 571-575.
 9. Singh, K. B. 1990. Winter Chickpea: Problems and potential in the Mediterraneans region. PP. 25-34. In: Present Status and Future Prospects of Chickpea Crop Production and Improvement in the Mediterranean Countries. Options Mediterranean, Serie A: Seminaires, Mediterraneans Numero 9, CIHEAM, Zaragoza, Spain.
 10. Udupa, S. M. and F. Weigand. 1997. Genotyping with microsatellite and RAPD markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. PP. 67-77. In: DNA Marker and Breeding Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. Proceedings of the Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker-assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas" (S. M. Udupa and F. Weigand, eds.). 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARDA, Aleppo, Syria.
 11. Van Rheenen, H. A. and M. P. Haware. 1997. Studies on inheritance of ascochyta blight resistance in chickpea. PP. 115-120. In: DNA Marker and Breeding Resistance to Ascochyta Crop Improvement: Marker-assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas" (S. M. Udupa and F. Weigand, eds.). 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARDA, Aleppo, Syria.
 12. Weising, K. D., J. Kaemmer, T. Epplen, F. Weigand, M. C. Saxena and G. Kahl. 1991. DNA fingerprinting of *A. rabiei* with synthetic Oligonucleotides. Curr. Genet. 19: 483-498.