

بررسی ارتباط میان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و شدت بیماری زایی جدایه‌های ایرانی

Ascochyta rabiei قارچ

مصطفی مطلبی^۱، محمد رضا زمانی^۲ و اباصلت حسین‌زاده کلاگر^۳

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در نخود (*Cicer arietinum*), بیماری برق‌زدگی است، که توسط قارچ *Ascochyta rabiei* ایجاد می‌شود. در این پژوهش ۴۳ جدایه از قارچ *Ascochyta rabiei* از بندر و گیاهان آلوده نخود، خالص‌سازی گردید، که از مناطق مختلف استان‌های کرمانشاه، همدان، کردستان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در طول سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۷۸ جمع‌آوری شده بود. برای تعیین شدت بیماری زایی، از محیط کشت *CDA* (*Chickpea seed meal dextrose agar*) استفاده گردید. در این روش، هر جدایه تحت شرایط آزمایشگاهی روی محیط *CDA* در دمای $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 (*JK04*، *JK08*، *JK10*، *JK13*، *JK14*، *JK17*، *JK19*، *JL01*، *JL10*، *JO00*، *JE04*، *JE06*) با شدت بیماری زایی زیاد (*HV*) و هفت جدایه (*IK03*، *IK06*، *JK15*، *JE01*، *JE08*، *JL04*) با شدت بیماری زایی کم (*WV*) هستند. جدایه‌های دیگر دارای شدت بیماری زایی متوسط (*MV*) بودند. فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز این جدایه‌ها روی محیط کشت *PZ* (*Pectin zymogram*) اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده با آزمون بیماری زایی حاصل از ۴۳ جدایه نشان داد که جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی زیاد در گروه بیماری زایی شدید، و جدایه‌های با فعالیت آنزیمی کم در گروه بیماری زایی کم قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: *Ascochyta rabiei*, بیماری زایی, 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

مقدمه

به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند (۲۰). توانایی پاتوژن‌های گیاهی برای تولید آنزیم‌هایی که پلی‌ساقاریدهای 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 دهیدروژنаз (Malate dehydrogenases)، استرازها (Esterases)، شیکیمیک دهیدروژناز (Shikimic dehydrogenases)، و پلی‌گالاکتوروناز (Polygalacturonase) را نام برد (۳ و ۲۶).

تخریب و خشک شدن نواحی آلوده با تخریب دیواره سلولی توسط آنزیم‌های مترشحه از پاتوژن صورت می‌گیرد. برای نخستین بار تناحکن و بارز (۲۶) در سال ۱۹۹۱ وجود آنزیم پلی‌گالاکتوروناز 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 باره تأثیر متقابل نخود و قارچ *Ascochyta rabiei* صورت می‌پذیرد، که یکی از آنها بررسی ایزوآنزیم‌های نزادهای مختلف قارچ در نخودهای مقاوم به برق‌زدگی است (۱۴).

A. rabiei در این پژوهش جدایه‌های مختلف قارچ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، از نظر شدت بیماری‌زایی و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز 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).

بیماری برق‌زدگی نخود یا *Ascochyta blight* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود (*Cicer arietinum*) است، که عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrnsse بوده (۱۵)، و به عنوان یک فاکتور اصلی محدود کننده تولید نخود محسوب می‌شود (۲۴). 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 (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت برای رشد قارچ در فصل رشد، این قارچ توانایی ایجاد خسارت زیادی را دارد، که با فرآگیر شدن بیماری، این میزان می‌تواند تا صد درصد محصول را از بین ببرد (۱، ۱۸ و ۲۵).

ن 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

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

کد نمونه	محل جمع‌آوری	تاریخ	کد نمونه	محل جمع‌آوری	تاریخ	کد نمونه	محل جمع‌آوری
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/ تالان دشت- حومه	۷۵/۴/۶	IL04	لرستان/ فیروزآباد- حومه	۷۷/۳/۲		
IK04	کرمانشاه/ ماهی دشت- قیماس	۷۵/۲/۳۱	IL06	لرستان/ الشتر- حومه	۷۷/۱/۲۷		
IK05	کرمانشاه/ گیلان غرب- حومه	۷۷/۲/۲۴	IL07	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۳۰		
IK06	کرمانشاه/ ماهی دشت- حومه	۷۷/۲/۲۴	IL09	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۱۴		
IK07	کرمانشاه/ صحنه- حومه	۷۷/۳/۱۵	IL10	لرستان/ گریت- حومه	۷۷/۳/۱۴		
IK08	کرمانشاه/ کنگاور- حسن آباد	۷۷/۳/۱۵	IO00	کردستان/ مریوان- زریبار	۷۷/۴/۱۱		
IK10	کرمانشاه/ سراورد- حومه	۷۷/۲/۲۷	IE01	آذ- غربی/ شبستر- حومه	۷۷/۴/۳		
IK11	کرمانشاه/ سراورد- حومه	۷۷/۲/۲۷	IE02	آذ- غربی/ شبستر- حومه	۷۷/۴/۱۵		
IK12	کرمانشاه/ سرپل ذهاب- سرآبگرم	۷۷/۳/۲۹	IE04	آذ- غربی/ شبستر- حومه	۷۷/۴/۶		
IK13	کرمانشاه/ سنقر- حومه	۷۷/۴/۲۲	IE05	آذ- غربی/ اهر- حومه	۷۷/۴/۱۴		
IK14	کرمانشاه/ سرپل ذهاب- حومه	۷۷/۲/۲۴	IE06	آذ- غربی/ اهر- حومه	۷۷/۴/۱۴		
IK15	کرمانشاه/ سراورد- حومه	۷۷/۳/۲۰	IE09	آذ- غربی/ خسرو شهر- تسوج	۷۷/۴/۱۵		
IK16	کرمانشاه/ گیلان غرب- چله	۷۴/۴/۸	IE10	آذ- غربی/ خسرو شهر- تسوج	۷۷/۴/۱۵		
IK17	کرمانشاه/ گیلان غرب- چشمۀ نظامی	۷۷/۲/۲۴	IW01	آذ- شرقی/ ارومیه- سرو	۷۷/۴/۲۳		
IK18	کرمانشاه/ سراورد- حومه	۷۷/۲/۲۱	IW02	آذ- شرقی/ ارومیه- شاهین دژ	۷۷/۴/۲		
IK19	کرمانشاه/ روانسر- حومه	۷۷/۲/۲۷	IK28	کرمانشاه/ سنقر- حومه	۷۷/۳/۲۵		
IK20	کرمانشاه/ هرسین- رایگان	۷۴/۴/۳	IK25	کرمانشاه/ هرسین- حومه	۷۷/۳/۱۰		
IK21	کرمانشاه/ هرسین- الیاسوند علیا	۷۴/۴/۳	IK26	کرمانشاه/ کنگاور- اکبر آباد	۷۴/۳/۲۲		
IK22	کرمانشاه/ کوزران- حومه	۷۷/۲/۱۲	IK27	کرمانشاه/ اسدآباد- حومه	۷۷/۳/۱۵		
IK23	کرمانشاه/ سنقر- ظلم آباد	۷۴/۴/۱۱					

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

=IE= جدایه‌های آذربایجان شرقی؛ IW= جدایه‌های آذربایجان غربی

کشت ۴۰ 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

محیط کشت نگهداری قارچ: برای نگهداری قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده گردید. برای انجام آزمون بیماری زایی قارچ، محیط کشت Chickpea Dextrose Agar (CDA) به کار رفت. به منظور تهیه این محیط

گردید. محلول به دست آمده به عنوان محلول حاوی آنزیم‌های مترشحه در مراحل بعدی به کار رفت.

فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز با استفاده از روش کالمر (۴) همراه با کمی تغییر، به شرح زیر اندازه‌گیری گردید: ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۲۱۰ میکرولیتر محلول ذخیره سوپسٹرا حاوی $0.3\% (w/v)$ پلی گالاکتورونیک اسید در لوله اپندورف مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر معرف مس $[1\% (w/v)]$ سدیم پتاسیم تارتارات، $0.34\% (w/v)$ کربنات سدیم، $0.3\% (w/v)$ سدیم هیدروژن کربنات و $0.14\% (w/v)$ سولفات سدیم، و نیز قرار دادن در حمام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سرد شدن، ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبدات $[5\% (w/v)]$ آمونیوم مولیبدات، $0.6\% (w/v)$ دی‌سدیم هیدروژن آرسنات و $0.42\% (w/v)$ اسید سولفوریک $[96\%]$ به مخلوط اضافه و سانتریفوژ شده ($12000\times g$)، جذب نوری در طول موج 500 نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر خوانده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برای هر جدایه در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از دی-گالاکتورونیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. در این شرایط، یک واحد آنزیم در مدت ۲۰ دقیقه، یک میکرومول اولیگو گالاکتورونیک تشکیل می‌دهد.

نتایج

در این پژوهش ۴۳ جدایه قارچ *A. rabiei* جمع‌آوری شده از مناطق شمال غرب و غرب کشور، شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان، لرستان و کرمانشاه، از نظر شدت بیماری‌زایی بررسی گردید. بدین منظور، نخودهای جوانه‌زده در تماس با کلنی جدایه‌های قارچ قرار داده شد، و در فواصل زمانی ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت میزان آلودگی ایجاد شده به گیاهچه‌ها بر حسب درصد آلودگی تعیین شد. برای هر جدایه قارچ در هر یک از زمان‌های فوق، میزان متوسط آلودگی ایجاد شده با درصد های صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ بیان

یک لیتر رسانده شد و pH آن برابر $6/5$ تنظیم گردید.

محیط کشت زایموگرم (Pectic Zymogram medium, PZ) برای فراهم کردن شرایط مناسب تولید آنزیم‌های پکتینی توسط جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei* از محیط کشت PZ معرفی شده به وسیله سویتینگهام و همکاران (۲۳) استفاده گردید. ده گرم پکتین (Citrus pectin, Merck) در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر حل، و به آن 20 گرم آگار، $2/64$ گرم سولفات آمونیوم، 0.34 گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات و $0/14$ گرم سولفات منیزیم افزوده شد. pH محیط فوق برابر $4/5$ تنظیم گردید. برای تهیه محیط کشت مزبور به صورت مایع، طبق همین دستور بدون افزودن آگار باید عمل کرد.

آزمون بیماری‌زایی: برای تعیین شدت بیماری‌زایی، جدایه‌های مختلف قارچ روی محیط کشت CDA کشت داده شد، و در دمای $22/5$ درجه سانتی گراد نگهداری گردید تا قطر کلنی قارچ به چهار سانتی‌متر برسد. از سویی، نخودها (رقم جم) با پرکلرات سدیم $0/25$ درصد به مدت پنج دقیقه ضدغونی گردید. پس با آب مقطر سترون شستشو داده شد. آنگاه نخودها در داخل پلیت سترون و مرطوب قرار گرفته، پس از جوانه زدن نخودها، طبق روش یانگ (۲۸) و دولمانس و همکاران (۹) گیاهچه‌ها مماس بر کلنی قارچ قرار داده شد و تا مدت 120 ساعت در دمای $22/5$ نگهداری گردید. هر 24 ساعت یک بار از گیاهچه‌های آلوهه یادداشت‌برداری شد. در هر مورد سه تکرار و در هر تکرار هشت گیاهچه بررسی شده، سرانجام درصد آلودگی ایجاد شده در گیاهچه‌ها بررسی و ارزیابی گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز: برای بررسی میزان تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز توسط قارچ *A. rabiei* جدایه‌های مختلف به طور جداگانه در 10 ml محیط کشت PZ با به هم زن 100 دور در دقیقه کشت داده شد. پس از شش روز میسلیوم قارچ‌ها در محیط‌های کشت مربوطه توسط کاغذ صافی و اتمن شماره یک جمع‌آوری شده، محیط صاف شده به مدت 30 دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ ($12000\times g$)

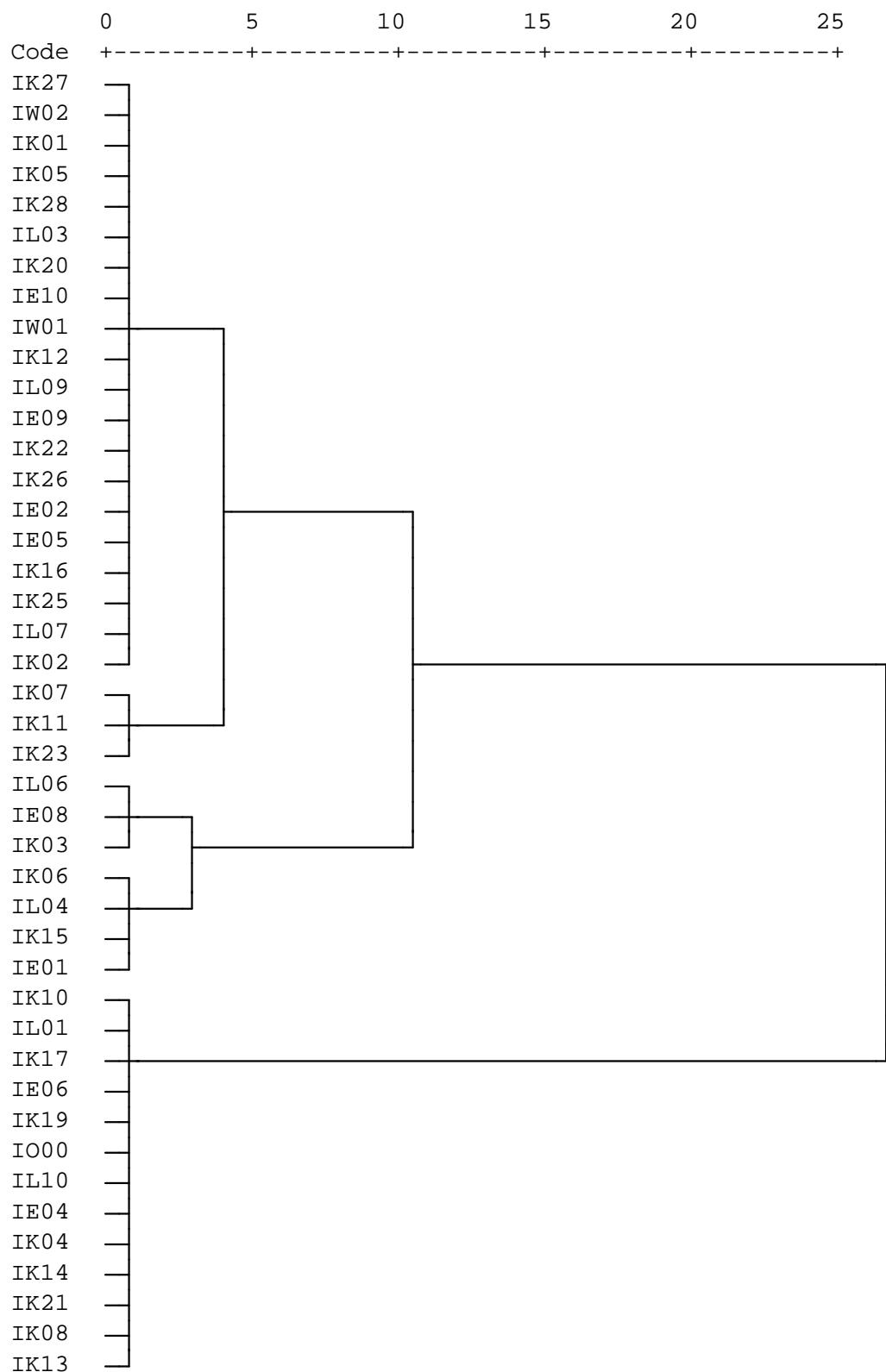
احتمال صد درصد با یکدیگر اختلاف دارند. بنابراین، تجزیه تابع تشخیص، گروه‌بندی جدایه‌ها را بر اساس تجزیه خوش‌های در فاصله پنج تأیید می‌کند. افراد موجود در هر یک از گروه‌ها از نظر شاخص تولید آنزیم پلی گالاکتورونناز صد درصد به گروه‌های حاصل از تجزیه خوش‌های تعلق دارند. بر این اساس، جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از نظر تولید آنزیم پلی گالاکتورونناز در چهار گروه واقعی قرار می‌گیرند. این چهار گروه به ترتیب عبارت‌اند از گروه اول شامل هشت جدایه گروه باشد، گروه سوم شامل ۱۵ جدایه ۰۱ JK01 تا ۰۶ JK06، ۰۷ IL06، ۰۸ IE01 تا ۰۴ IL04، ۰۳ IL07، ۰۲ IL08 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی کمتر از سه واحد (3U/ml/min) هستند، گروه دوم شامل ۹ جدایه ۰۵ JK05 تا ۰۳ IL03، ۰۲ JW02، ۰۱ JK16، ۰۰ IE09، ۰۷ JK07، ۰۶ JK27 که میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونناز آنها ۳-۶ واحد (3-6U/ml/min) می‌باشد، گروه سوم شامل ۱۵ جدایه ۰۱ JK01 تا ۰۶ JK06، ۰۷ IL06، ۰۸ IE01 تا ۰۴ IL04، ۰۹ JK23، ۱۰ JK02، ۱۱ JK11، ۱۲ JK25، ۱۳ JK19، ۱۴ JK21، ۱۵ JK20، ۱۶ JK28 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی آنها ۶-۳ واحد (3-6U/ml/min) هستند. جدایه ۰۱ JK01 تا ۰۶ JK06، ۰۷ IL06، ۰۸ IE01 تا ۰۴ IL04، ۰۹ JK23، ۱۰ JK02، ۱۱ JK11، ۱۲ JK25، ۱۳ JK19، ۱۴ JK21، ۱۵ JK20، ۱۶ JK28 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی آنها ۶-۳ واحد (3-6U/ml/min) هستند.

بحث

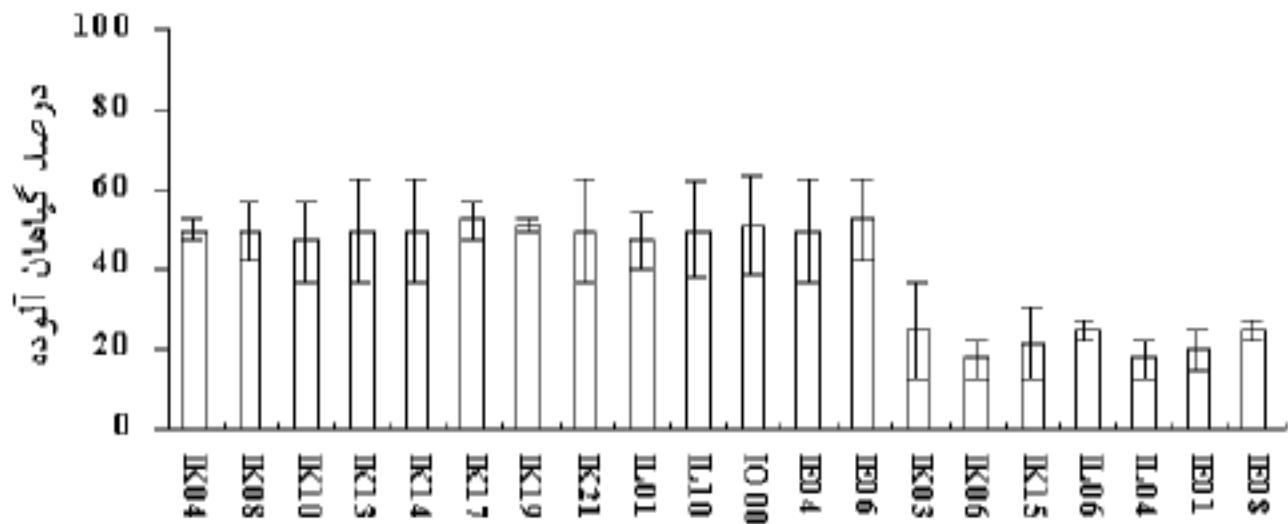
استفاده از آزمون‌های بیماری زایی، که به اثر متقابل پاتوژن و میزبان می‌پردازد، یک روش متداول در دسته‌بندی قارچ‌هاست (۲۷). گزارش‌های بسیاری مبنی بر دسته‌بندی جدایه‌های قارچ شدت بیماری زایی وجود دارد. جدایه‌های قارچ *A. rabiei* شدت بیماری زایی جمع‌آوری شده در کشورهای مختلف، از نظر تنوع *A. rabiei* جمع‌آوری شده از آمریکا بر اساس بررسی شدت بیماری زایی تقسیم شده، و ۱۱ گروه با شدت بیماری زایی مختلف معرفی شده است (۱۲). فیشر و همکاران (۱۰) جدایه‌های قارچ *A. rabiei* متعلق به ایتالیا را از نظر شدت بیماری زایی بررسی کرده، آنها را بر این اساس دسته‌بندی کردند. برای نخستین بار،

گردید. سرانجام، برای هر جدایه ۲۴ پارامتر (حاصل در صدھای آلوودگی در فواصل زمانی) تعیین شد. با استفاده از روش تجزیه خوش‌های، ۴۳ جدایه قارچ *A. rabiei* مورد بررسی در این پژوهش، در فاصله پنج، به سه گروه با درجه بیماری زایی متفاوت تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). 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 بیماری زایی در سه گروه واقعی (کلاستر) قرار می‌گیرند. این سه گروه به ترتیب دارای ۲۳ جدایه با شدت بیماری زایی متوسط (۲۵ تا ۴۷/۵ درصد) به عنوان MV (Moderately virulent)، هفت جدایه با شدت بیماری زایی کم (کمتر از ۲۵ درصد) به عنوان WV (Weakly virulent) و ۱۳ جدایه با شدت بیماری زایی زیاد (بیشتر از ۴۷/۵ درصد) به عنوان جدایه‌های HV (Highly Virulent) می‌باشند. بنابراین، از میان جدایه‌های مورد بررسی، ۱۳ جدایه ۰۴ IE04 تا ۰۱ IL01، ۰۰ IO00، ۰۱ JK19، ۰۲ JK17، ۰۳ JK15، ۰۴ JK13، ۰۵ JK14، ۰۶ JK10، ۰۷ JK08، ۰۸ JK06، ۰۹ IK06، ۱۰ IK15، ۱۱ IK06، ۱۲ IK21، ۱۳ IK03، ۱۴ IE08، ۱۵ IE01 و ۱۶ IL04 به عنوان HV و هفت جدایه ۰۶ IK06 و ۰۷ WV معرفی شدند (شکل ۲).

میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونناز با اندازه‌گیری محصول ایجاد شده توسط این آنزیم در مخلوط واکنش به وسیله معرفه‌های مس و آرسنومولیبدات، بر اساس روش کالمر (۴) تعیین شد. تجزیه خوش‌های نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونناز در جدایه‌های مختلف به روش UPGMA انجام شد. گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر میزان تولید آنزیم پلی گالاکتورونناز توسط تجزیه خوش‌های در شکل ۳ 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



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌های میانگین وزنی آلودگی‌های ایجاد شده در ۴۳ جدایه قارچ *Ascochyta rabiei* در شرایط آزمایشگاهی



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

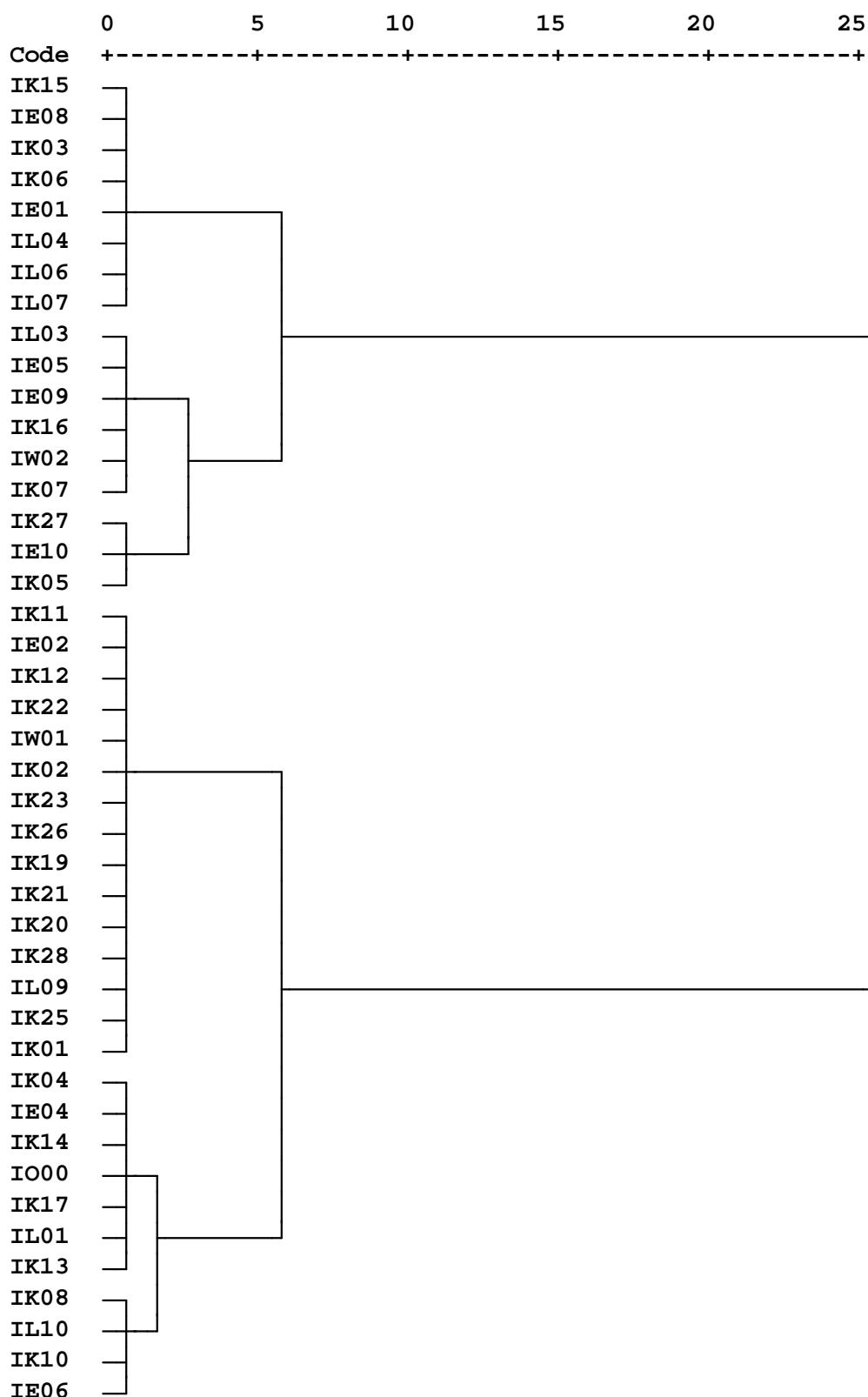
از ۴۳ جدایه *A. rabiei* مورد بررسی هفت جدایه IL06، IL08، JK15، JK03، IE01 و IL04 که به عنوان جدایه‌های WV معرفی شده بودند، دارای کمترین میزان فعالیت آنژیم پلی گالاکتوروناز (کمتر از سه واحد فعالیت در دقیقه در یک میلی لیتر محلول آنژیمی)، و ۱۱ جدایه JK10، IL10، JE06، JK10، IL10، JE06 و JK08 که به عنوان جدایه‌های HV معرفی شده بودند، دارای بیشترین میزان فعالیت آنژیم پلی گالاکتوروناز (بیشتر از ۹ واحد فعالیت در دقیقه در یک میلی لیتر) بودند.

مقایسه نتایج مربوط به گروههای چهارگانه به دست آمده در این روش با گروههای حاصل از آزمایش بیماری زایی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ۱۱ جدایه JK10، JK13، JK08، JK04، IE04، IE06، IK14، IK17، IL10، IO00 و ۶ جدایه JK04، JK13، JK10، JK08، IE04، IE06، IK14، IK17، IL10، IO00 و ۹ جدایه JK04، JK13، JK10، JK08، IE04، IE06، IK14، IK17، IL10، IO00 که در گروه IV قرار می‌گیرند، دارای فعالیت آنزیمی بیشتر از ۹ واحد هستند. صد درصد این جدایه‌ها HV بوده و در گروه III آزمون بیماری زایی نیز قرار دارد.

همه جدایه‌های WV (JK03، JK06، JE01، JL04، JL06) و IK15 (IK08) دارای فعالیت آنژیم پلی گالاکتورونازی کمتر از سه واحد هستند. این جدایه‌ها در هر دو گروه‌بندی در دسته‌های جداگانه قرار می‌گیرند (گروه II آزمون پیماری‌زایی، و

در این پژوهش بررسی بیماری زایی 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 سماوی زایی، دسته‌بندی کرد.

یکی از عوامل مهم در بیماری زایی قارچ‌ها، آنزیم‌های پکتینکی است، که با تجزیه ترکیبات پکتینی دیواره 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 (۱۶). اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم‌های پکتینی همچون پلی‌گالاكتوروناز 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 پلی‌گالاكتوروناز‌های مترشحه از قارچ *Ascochyta rabiei* گزارش گردیده است (۲۶)، اندازه‌گیری فعالیت پلی‌گالاكتوروناز می‌تواند یکی دیگر از روش‌های سنجش میزان بیماری زایی و گوهنندی جدایه‌های مختلف باشد.



شکل ۳. دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌های فعالیت آنزیم PG ۴۳ جدایه، که با استفاده از تفاوت بین جدایه‌ها به روش UPGMA و با برنامه SPSSWIN رسم گردید

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.

گروه I فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز). با توجه به همبستگی میزان تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز و شدت بیماری زایی جدایه‌های مختلف، احتمالاً این آنزیم در بیماری زایی جدایه‌های مختلف *A. rabiei* نقش دارد. این یافته با گزارش‌های ارائه شده در زمینه اهمیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در جدایه‌های بیماری‌زای قارچ *Rhizoctonia solani* (۳۲) و *Fusarium oxysporum* (۳۳) هم خوانی دارد.

منابع مورد استفاده

1. اخوت، م. (۱۳۵۷). مطالعه در مورد چند روش مبارزه علیه قارچ *Ascochyta rabiei* عامل برق زدگی نخود ایرانی. علوم کشاورزی ایران، ۲(۴): ۷-۱۶.
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-assisted 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, expression, 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. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting in the palouse. 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.

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 inoculum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Seed Sci. Technol.* 3: 667-681.
16. Mikes, O., J. Sedlackova 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-assisted 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. Host 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.