

بررسی ارتباط میان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز و شدت بیماری زایی جدایه های ایرانی

قارچ *Ascochyta rabiei*

مصطفی مطلبی^۱، محمدرضا زمانی^۲ و اباصلت حسین زاده کلاگر^۳

چکیده

یکی از مهم ترین بیماری ها در نخود (*Cicer arietinum*)، بیماری برق زدگی است، که توسط قارچ *Ascochyta rabiei* ایجاد می شود. در این پژوهش ۴۳ جدایه از قارچ *Ascochyta rabiei* از بذور و گیاهان آلوده نخود، خالص سازی گردید، که از مناطق مختلف استان های کرمانشاه، لرستان، همدان، کردستان، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در طول سال های ۱۳۷۶ تا ۱۳۷۸ جمع آوری 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. آسیب های ناشی از حمله قارچ به قسمت های مختلف گیاهچه های نخود رقم جم به طور روزانه تا روز پنجم ارزیابی، و از صفر تا صد درصد درجه بندی شد.

نتایج نشان داد که ۱۳ جدایه (*IK04* و *IK08* *JK10* *JK13* *JK14* *JK17* *JK19* *JK21* *JK01* *JK10* *JO00* *JE04* *JE06*) با شدت بیماری زایی زیاد (*Highly virulent, HV*) و هفت جدایه (*IK03* و *IK06* *JK15* *JE01* *JE08* *JK04* *JK06*) با شدت بیماری زایی کم (*Weakly virulent, WV*) هستند. جدایه های دیگر دارای شدت بیماری زایی متوسط (*Moderately virulent, MV*) بودند. فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز این جدایه ها روی محیط کشت PZ (*Pectin zymogram*) اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده با آزمون بیماری زایی حاصل از ۴۳ جدایه نشان داد که جدایه های دارای فعالیت آنزیمی زیاد در گروه بیماری زایی شدید، و جدایه های با فعالیت آنزیمی کم در گروه بیماری زایی کم قرار دارند.

واژه های کلیدی: *Ascochyta rabiei*، بیماری زایی، آنزیم پلی گالاکتوروناز

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

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 (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 (۶، 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)، استرازاها (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 تنحاکن 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 نژادهای مختلف قارچ در نخودهای مقاوم به برقزدگی است (۱۴).

در این پژوهش جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei* 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).

جدول ۱. جدایه های قارچ *Ascochyta rabiei* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران

کد نمونه	محل جمع آوری	تاریخ	کد نمونه	محل جمع آوری	تاریخ
IK01	کرمانشاه / درود فرامان - کرانی	۷۶/۳/۷	IL01	لرستان / کرم آباد - حومه	۷۷/۳/۲۰
IK02	کرمانشاه / دینور - گنداب سفلی	۷۶/۳/۲۲	IL03	لرستان / کرم آباد - حومه	۷۷/۳/۲۲
IK03	کرمانشاه / تالان دشت - حومه	۷۵/۴/۶	IL04	لرستان / فیروز آباد - 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 / گری - حومه	۷۷/۳/۳۰
IK06	کرمانشاه / ماهی دشت - حومه	۷۷/۲/۲۴	IL09	لرستان / گری - حومه	۷۷/۳/۱۴
IK07	کرمانشاه / صحنه - حومه	۷۷/۳/۱۵	IL10	لرستان / گری - حومه	۷۷/۳/۱۴
IK08	کرمانشاه / کنگاور - حسن آباد	۷۷/۳/۱۵	IO00	کردستان / مریوان - زیربار	۷۷/۴/۱۱
IK10	کرمانشاه / سرارود - حومه	۷۷/۲/۲۷	IE01	آذ - غربی / شبستر - حومه	۷۷/۴/۳
IK11	کرمانشاه / سرارود - حومه	۷۷/۲/۲۷	IE02	آذ - غربی / شبستر - حومه	۷۷/۴/۱۵
IK12	کرمانشاه / سرپل ذهاب - سرآب گرم	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 / سرارود - حومه	۷۷/۳/۲۰	IE09	آذ - غربی / خسروشهر - تسوج	۷۷/۴/۱۵
IK16	کرمانشاه / گیلان غرب - چله	۷۴/۴/۸	IE10	آذ - غربی / خسروشهر - تسوج	۷۷/۴/۱۵
IK17	کرمانشاه / گیلان غرب - چشمه نظامی	۷۷/۲/۲۴	IW01	آذ - شرقی / ارومیه - سرو	۷۷/۴/۲۳
IK18	کرمانشاه / سرارود - 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= جدایه های کرمانشاه ؛ IL= جدایه های لرستان ؛ IO= جدایه های کردستان؛

IE= جدایه های آذربایجان شرقی ؛ IW= جدایه های آذربایجان غربی

کشت ۴۰ گرم آرد نخود در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و عصاره حاصل با پارچه کتان 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

یک لیتر رساننده شد و pH آن برابر ۶/۵ تنظیم گردید.

محیط کشت زایموجرم (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 سوییتینگهام و همکاران (۲۳) استفاده گردید. ده گرم پکتین (Citrus pectin, Merck) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل، و به آن ۲۰ گرم آگار، ۲/۶۴ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۳۴ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات و ۰/۱۴ گرم سولفات منیزیم افزوده شد. pH محیط فوق برابر ۴/۵ 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 ۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا قطر کلنی قارچ به چهار سانتی‌متر برسد. از سویی، نخودها (رقم جم) با پرکلرات سدیم ۰/۲۵ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی گردید. سپس 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 ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۲/۵ نگهداری گردید. هر ۲۴ ساعت یک بار از گیاهچه‌های آلوده 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 پلی‌گالاکتوروناز: برای بررسی میزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز توسط قارچ *A. rabiei*، جدایه‌های مختلف به طور جداگانه در ۱۰ ml محیط کشت PZ با به‌هم‌زن (۱۰۰ دور در دقیقه) کشت داده شد. پس از شش روز میسلیم قارچ‌ها در محیط‌های کشت مربوطه توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک جمع‌آوری شده، محیط صاف شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتیفریوژ ($12000 \times g$)

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

فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز 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 سوبسترا حاوی ۰/۳ درصد (w/v) پلی‌گالاکتورونیک اسید در لوله اپندورف مخلوط شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر معرف مس [۱٪ (w/v) سدیم پتاسیم تارتارات، ۲٪ (w/v) کرینات سدیم، ۰/۳٪ (w/v) سدیم هیدروژن کرینات و ۱۴٪ (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 آرسنومولیدات [۵٪ (w/v) آمونیوم مولیدات، ۰/۶٪ (w/v) دی‌سدیم هیدروژن آرسنات و ۴/۲٪ (w/v) اسید سولفوریک ۹۶٪] به مخلوط اضافه و سانتیفریوژ شده ($12000 \times g$)، جذب نوری در طول موج ۵۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر 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 اولیگوگالاکتورونیک 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 درصدهای صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ بیان

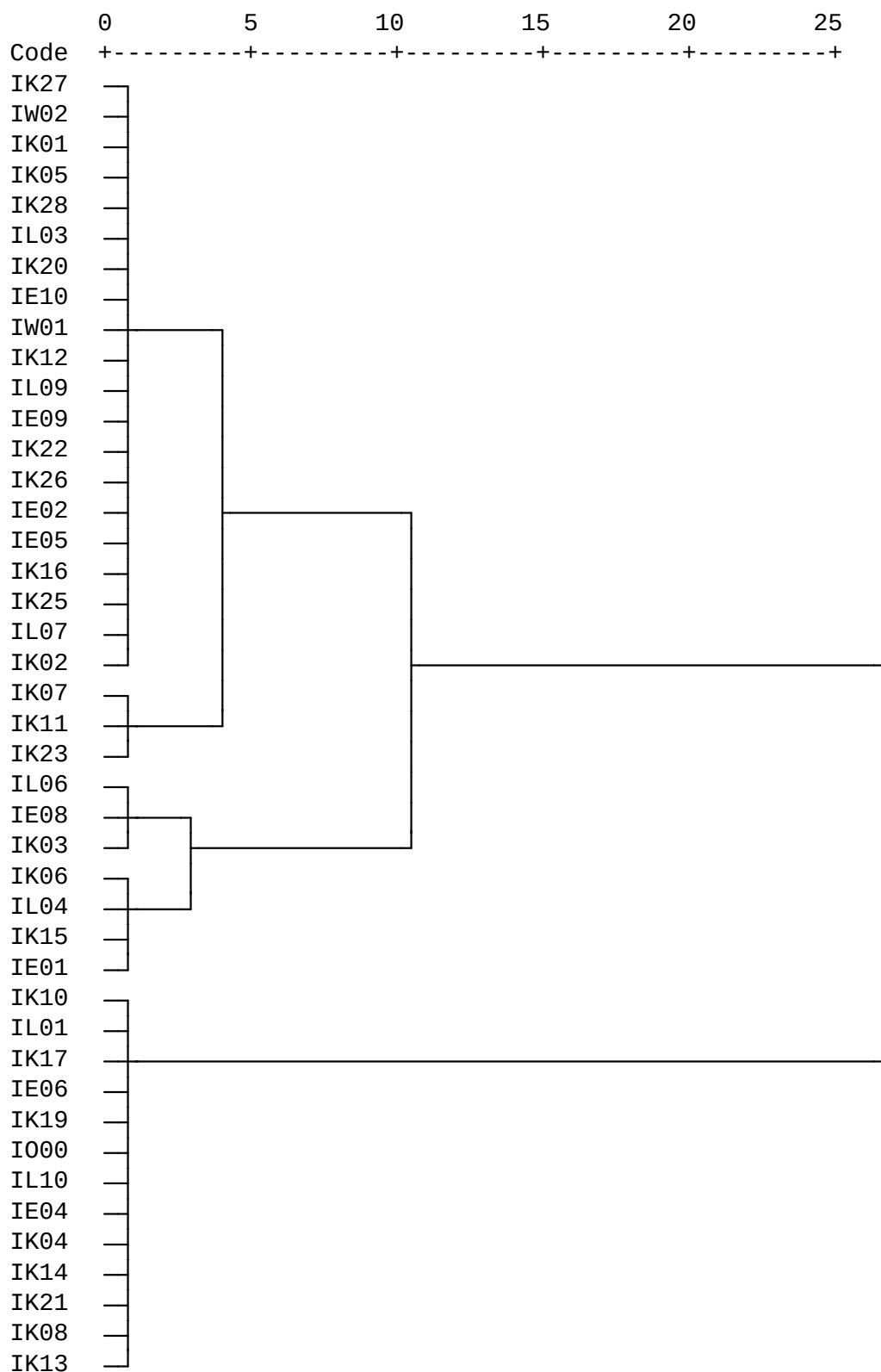
گردید. سرانجام، برای هر جدایه ۲۴ پارامتر (حاصل درصدهای آلودگی در فواصل زمانی) تعیین شد. با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای، ۴۳ جدایه قارچ *A. rabiei* مورد بررسی در این پژوهش، در فاصله پنج، به سه گروه با درجه بیماری‌زایی متفاوت تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱). تجزیه تابع تشخیص در مورد گروه‌های سه‌گانه‌ای که در فاصله 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 بیماری‌زایی در سه گروه واقعی (کلاستر) قرار می‌گیرند. این سه گروه به ترتیب دارای ۲۳ جدایه با شدت بیماری‌زایی متوسط (۲۵ تا ۴۷/۵ درصد) به عنوان MV (Moderately virulent)، هفت جدایه با شدت بیماری‌زایی کم (کمتر از ۲۵ درصد) به عنوان WV (Weakly virulent) و ۱۳ جدایه با شدت بیماری‌زایی زیاد (بیشتر از ۴۷/۵ درصد) به عنوان جدایه‌های HV (Highly Virulent) می‌باشند. بنابراین، از میان جدایه‌های مورد بررسی، ۱۳ جدایه IL01, IO00, IE04, JK04, JK08, JK10, JK15, JK14, JK13, JK17, JK19, IK21 و IK06 به عنوان HV و هفت جدایه IL06, IL04, IE01, IE08, IK03 و IK06 به عنوان WV معرفی شدند (شکل ۲).

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

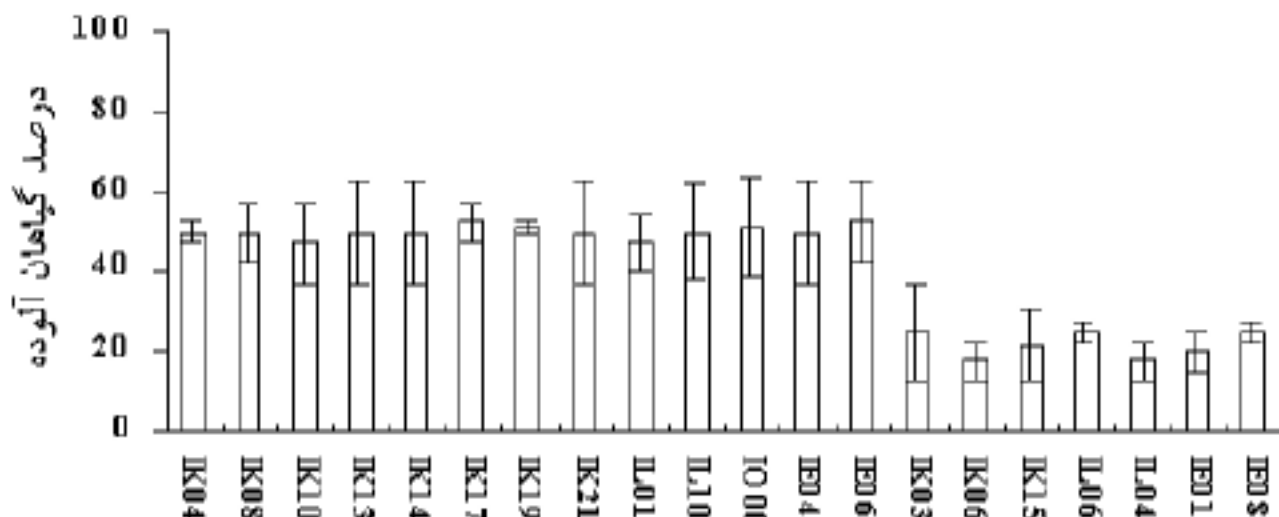
احتمال صد درصد با یکدیگر اختلاف دارند. بنابراین، تجزیه تابع تشخیص، گروه‌بندی جدایه‌ها را بر اساس تجزیه خوشه‌ای در فاصله پنج تأیید می‌کند. افراد موجود در هر یک از گروه‌ها از نظر شاخص تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز صد درصد به گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای تعلق دارند. بر این اساس، جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از نظر تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز در چهار گروه واقعی قرار می‌گیرند. این چهار گروه به ترتیب عبارت‌اند از گروه اول شامل هشت جدایه JK03, JK06, IE01, IL04, IL06, IL07, IK15 و IE08 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی کمتر از سه واحد (3U/ml/min) هستند، گروه دوم شامل ۹ جدایه IL03, JK05, IE05, IE09, JK16, JW02, JK07, IK27 و IE10 که میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز آنها ۳-۶ واحد (3-6U/ml/min) می‌باشد، گروه سوم شامل ۱۵ جدایه JK23, JK02, JK01, JK26, JK19, JK21, JK20, JK28, IL09, JK25, JK11, IE02, JK12, IK22 و IW01 که فعالیت آنزیمی آنها ۶-۸ واحد (6-8U/ml/min) اندازه‌گیری گردید، و گروه چهارم شامل ۱۱ جدایه JK04, IE06, JK10, IL10, JK08, JK13, IL01, JK17 و IE04, IK14 و IO00 که تمام جدایه‌ها دارای فعالیت آنزیمی بیشتر از ۹ واحد (9U/ml/min) هستند.

بحث

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



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 آلودگی ریشه نخود توسط جدایه های مختلف HV و WV قارچ *Ascochyta rabiei*

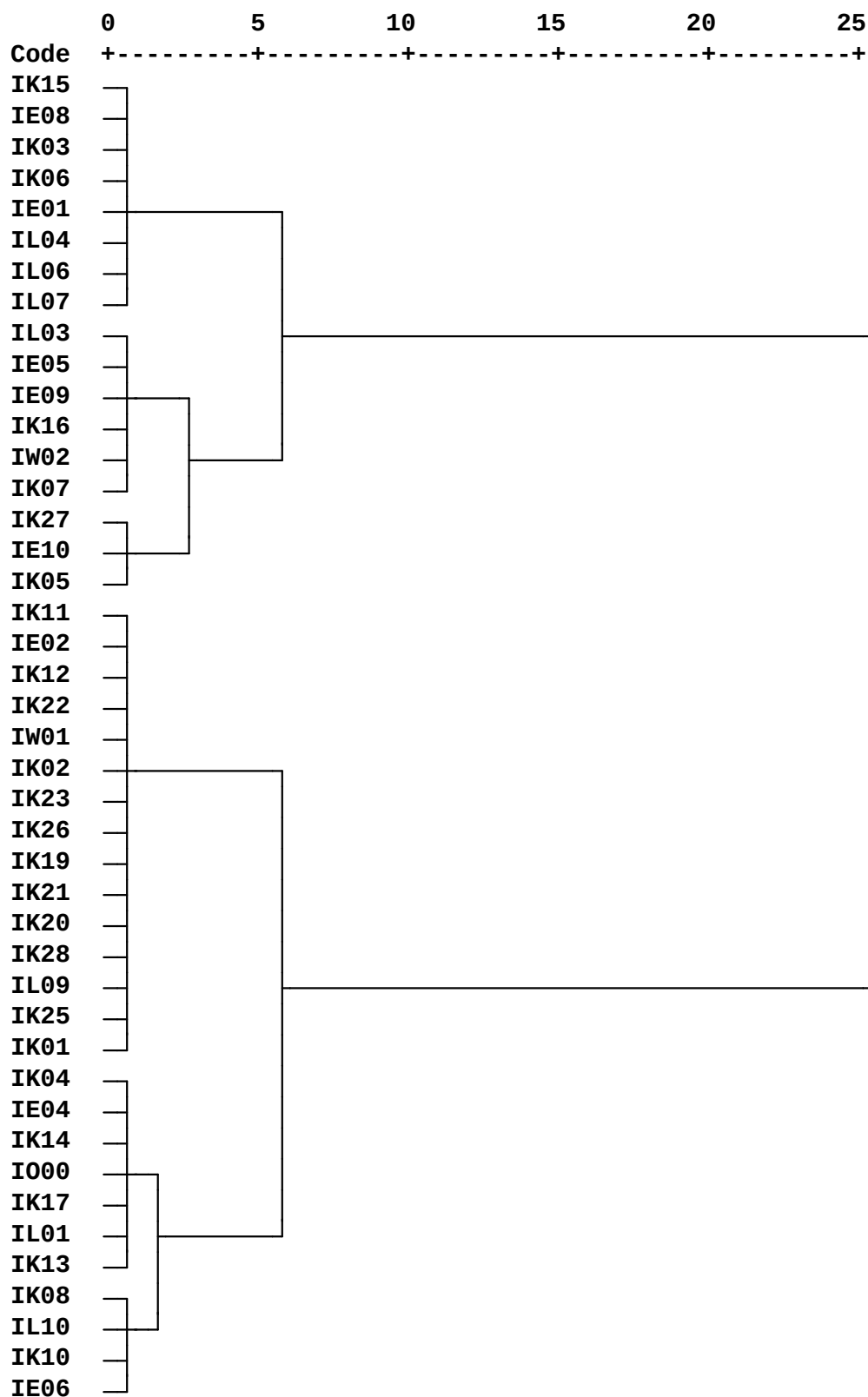
از ۴۳ جدایه *A. rabiei* مورد بررسی هفت جدایه IL06، JK15، JK08، JK03، IE01 و IL04 که به عنوان جدایه های WV معرفی شده بودند، دارای کمترین میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (کمتر از سه واحد فعالیت در دقیقه در یک میلی لیتر محلول آنزیمی)، و ۱۱ جدایه IL10، JK10، IE06، JK04، IE04، JK14، IO00، JK17، IL01، IK13 و IK08 که به عنوان جدایه های HV معرفی شده بودند، دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (بیشتر از ۹ واحد فعالیت در دقیقه در میلی لیتر) بودند.

مقایسه نتایج مربوط به گروه های چهارگانه به دست آمده در این روش با گروه های حاصل از آزمایش بیماری زایی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که ۱۱ جدایه JK08، JK10، JK13، JK04، IE04، IO00، IL10، IL1، JK17، IK14 و IE06 که در گروه IV قرار می گیرند، دارای فعالیت آنزیمی بیشتر از ۹ واحد هستند. صد درصد این جدایه ها HV بوده و در گروه III آزمون بیماری زایی نیز قرار دارند.

همه جدایه های WV (JK03، JK06، IE01، IL04، IL06، IK15 و IK08) دارای فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونازی کمتر از سه واحد هستند. این جدایه ها در هر دو گروه بندی در دسته های جداگانه قرار می گیرند (گروه II آزمون بیماری زایی 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 گروه بندی جدایه ها بر اساس میانگین میزان آلودگی ایجاد شده، می توان جدایه های قارچ *A. rabiei* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران را در سه گروه متفاوت از نظر شدت بیماری زایی دسته بندی کرد.

یکی از عوامل مهم در بیماری زایی قارچ ها، آنزیم های پکتیکی است، که با تجزیه ترکیبات پکتینی دیواره سلولی میزبان، نخستین مراحل آلودگی را فراهم می سازند. بنابراین، بررسی میزان تولید و فعالیت این آنزیم ها در جدایه های مختلف قارچ، معیار مناسبی برای دسته بندی این جدایه ها است (۱۶). اندازه گیری مقدار فعالیت آنزیم های پکتینی همچون پلی گالاکتوروناز و ... در جدایه هایی که در زمان های یکسان در محیط کشت مایع رشد یافته اند، یک روش معمول آزمایشگاهی است (۲)، و چون تخریب بافت های آلوده به *Ascochyta blight* در اثر فعالیت آنزیم های پکتینی، به ویژه پلی گالاکتورونازهای مترشح شده از قارچ *Ascochyta rabiei* گزارش گردیده است (۲۶)، اندازه گیری فعالیت پلی گالاکتوروناز می تواند یکی دیگر از روش های سنجش میزان بیماری زایی و گروه بندی جدایه های مختلف *Ascochyta rabiei* 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 پژوهش های علمی کشور انجام یافته است، که بدین وسیله صمیمانه تشکر می گردد. از آقای مهندس حسن یونسی کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه، به خاطر اهدای تعدادی از جدایه های قارچ تشکر و قدردانی می گردد.

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

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(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. Dulleman, 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.

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 inouulum 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- 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. *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*.