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

امیر دریایی، ماهرخ فلاحتی رستگار و بهروز جعفرپور[1]

چکیده

تفاوت بیماری‌زایی 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 الکترولیت‌های سدیم و پتاسیم در ساقه گیاهچه‌های نخود آلوده و سالم ارقام حساس و پایدار. ج) بررسی تأثیر تنش نبود پتاسیم در محیط غذایی هوگلند برای پنج رقم افتراقی نخود. د) امکان دیدن تفاوت‌های ژنومی دو پاتوتیپ با روش RAPD-PCR.

مشاهده میانگین ۹ ژن اصلی پایداری در رقم بومی ۱۴۴-۶۰-۱ از کل ده ژن تعیین شده پایداری به بیماری برق‌زدگی طبق روش ونرینن و هاوار (۱۹۹۷)، نشان دهنده غنی بودن این رقم از لحاظ ژن‌های پایداری، و امکان استفاده از آن در کارهای به‌نژادی است. در حالی که ارقام دیگر نسبتاً متحمل تا کاملاً حساس بوده و ژن‌های پایداری اندکی داشتند. کاهش شدید غلظت الکترولیت‌ها در رقم حساس ILC۱۹۲۹ *در مقایسه با رقم پایدار* ILC۵۹۲۸ *نشان دهنده وجود سازگاری میان بیمارگر و گیاه میزبان است. افزایش پایداری ارقام افتراقی در نتیجه تنش نبود پتاسیم، گویای القای پایداری اکتسابی در نتیجه 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

تاکنون ۵۰ بیماری در نخود از سراسر جهان شناسایی شده، که بیماری برق‌زدگی نخود ناشی از قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass.)Lab. زیان‌بارترین آنهاست. این بیماری از ۳۲ کشور گزارش گردیده، و در سال‌های همه‌گیری بیماری خسارت ناشی از آن به ۱۰۰ درصد می‌رسد (۹).

قارچ عامل بیماری در مرحلهٔ جنسی با نام *Didymella rabiei* (Kovachevski) Von Arx. قارچی است با اندام بارده سودوتسیوم، که برای تولید مثل به دو پایهٔ سازگار MAT۱-۱ و

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

۲-۱MAT نیاز دارد (۶). قارچ عامل بیماری به صورت بذرزاد، هوازاد یا روی بقایای آلوده گیاهی به گیاه سالم منتقل شده و آلودگی را گسترش می‌دهد.

ونرینن و هاوار (۱۱) با تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از گزینش ارقام نخود در نقاط مختلف، با آزمایش گلخانه‌ای در رقم ۵۷۶-۰۴۸-۱ نخود نتیجه گرفتند که توارث پایداری به بیماری برق‌زدگی کمّی است. آنها از مشاهدهٔ افت محصول در ارقامی مانند C۱۲/۳۴، C۲۳۵، C۷۲۷ و CM۷۲ 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 سنجیده می‌شود، که در آن بدون علامت برابر ۱، و گیاه مرده برابر ۹ می‌باشد (۶)، هر آلل درجهٔ پایداری به بیماری را تا ۰/۴ کاهش می‌دهد، و در جایی که همهٔ آلل‌های پایداری حضور دارند (۸=۴/۰×۲۰)، درجهٔ بیماری (۱=۸-۹) مساوی ۱، و در صورت حضور تنها آلل‌های حساسیت (۸=۴/۰×۲۰)، درجهٔ بیماری (۹=۱+۸) 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 سوبره 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 لایهٔ محافظ در ارقام پایدار بسیار ضخیم‌تر و گسترده‌تر از ارقام حساس است.

پالوان اونسال (منتشر نشده) با بررسی تأثیر تنش 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 افزایش 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 سم‌زدا از جانب بیمارگر است. آنها در بررسی قارچ *Nectria haematococca* متوجه شدند که این قارچ دارای چهار ژن MAK۱ تا MAK۴ است، که قادر به تجزیه فیتوآلکسین ماکیان‌نخود می‌باشد.

آدوپا و ویگاند (۱۰) با استفاده از روش PCR-RAPD جدایه‌های قارچ *A. rabiei* از سوریه را با گونهٔ *A. faba f.sp. lentis* مقایسه نمودند، که باندهای حاصل تفاوت این دو گونه را نشان می‌داد، در حالی که در بررسی‌های ظاهری تمایز این دو گونه به سختی امکان‌پذیر است. هم‌چنین، این دو با استفاده از آغازگر $(GATA)_4$ توانستند ژنوتیپ‌های قارچ مذکور و فراوانی آنها را در سوریه به دست آورند. وایزینگ و همکاران (۱۲) دریافتند که توالی‌های الگونوکلئوتید مکمل ریزماهواره‌ها 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 لا، سوسپانسیون اسپوری با غلظت ۲×۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

تهیه گردید (۹).

اندازه‌گیری غلظت یون‌های پتاسیم و سدیم در ساقهٔ 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 (ILC۱۹۲۹) و پایدار (ILC۵۹۲۸) تکه‌هایی جدا شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای محاسبهٔ میزان عناصر موجود در بافت‌های گیاهی، نخست مقداری از اندام و بافت مربوط در دمای ۶۰-۷۰ 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 درجهٔ 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 به‌هم زدن آن حدود سه میلی‌لیتر از محلول باقی ماند. پس از انجام این مراحل، نمونه‌ها در بالن ژوژهٔ ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شدند (۲).

برای کالیبره کردن دستگاه از محلول خالص پتاسیم و سدیم با غلظت ۵۰ppm استفاده شد. سپس هر یک از محلول‌های به دست آمده در مراحل مختلف رشدی گیاه به بخش مکندهٔ دستگاه فلیم فتومتر متصل گردید و عدد نمایش‌دهندهٔ دستگاه یادداشت شد. پس از هر بار اندازه‌گیری توسط آب مقطر، مسیر عبور محلول‌ها در دستگاه شست‌شو شد (۲).

روش PCR

DNA استخراج شده از میسلیوم دو پاتوتیپ و یک نمونه شاهد از جدایه‌های کرمانشاه، با غلظت مناسب ۵۰۰-۷۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، طبق روش مولیس و همکاران (۷)، به همراه مواد جدول ۱ در دستگاه PCR قرار گرفت.

جدول ۱. اجزای مورد نیاز برای RAPD-PCR

مواد	غلظت	حجم (μ)
ddH_2O	-	۳۷
PCR Buffer	۱۰X	۵
$MgCl_2$	۵۰mM	۲
dNTP	۱۰mM	۲
Primer	۶۰ng	۱/۵
DNA template	۲۰ng	۱/۵
Taq. Poly	۵U/μl	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).

$$Nei=2\times N_{(1,1)}/NA_{(1,0)}+NB_{(0,1)}$$

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

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

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

بررسی گلخانه‌ای

روش‌های ثبت علایم، واکنش‌ها و شدت بیماری‌زایی

در این بررسی‌ها ثبت درجه واکنش بر پایهٔ 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 نهایتاً 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 متحمل، و درجات ۶/۱ تا ۹ به عنوان حساس می‌باشند. سرانجام، شدت بیماری‌زایی پاتوتیپ‌ها با استفاده از مقیاس

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

جان و وایز، که در آن تیپ‌های آلودگی ۱ تا ۵/۹ نشان‌دهنده شدت بیماری‌زایی کم و درجات ۶ تا ۹ نشان‌دهندهٔ شدت بیماری‌زایی 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 دهانهٔ ۱۵ سانتی‌متر حاوی خاک، ماسه و خاک برگ به نسبت ۳:۱:۱ در سه تکرار و عمق ۲/۵ سانتی‌متر کشت گردید.

مایه‌زنی قارچ عامل بیماری در مرحلهٔ گیاهچه‌ای

گیاهچه‌های ۱۵ روزه نخود زیر پوشش پلاستیکی با دمای ۱۹ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ تا ۹۵ درصد، با سوسپانسیون اسپور هر یک از پاتوتیپ‌ها به میزان دو میلی‌لیتر برای هر گلدان اسپورپاشی شدند. پس از یک هفته، با برداشتن پوشش، یادداشت‌برداری علایم در طی دو هفته انجام گرفت (۹). برای از بین بردن کشش سطحی آب و جلوگیری از ریزش قطرات آب به هنگام اسپورپاشی، از دترژنت توین ۲۰ به میزان یک قطره در ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور، و نیز قرار دادن گیاهان مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت خارج از پوشش پلاستیکی، به منظور کاهش رطوبت و جلوگیری از سقوط قطرات سوسپانسیون اسپور واقع بر گیاه استفاده شد.

مایه زنی قارچ عامل بیماری در مرحلهٔ بلوغ

گیاهان دارای غلاف مانند مرحلهٔ گیاهچه‌ای اسپورپاشی شدند، و مراحل یادداشت‌برداری علایم نیز همچون روش قبل صورت گرفت.

بررسی تأثیر تنش نبود پتاسیم در محیط غذایی نخود

به منظور بررسی تأثیر تنش نبود پتاسیم در محیط غذایی نخود،

جدول ۲. مشخصات ۱۸ رقم نخود بومی

ردیف	مبدأ	شمارهٔ رقم
۱	مشهد	۱۸-۶۷-۱۸۰
۲	کرمانشاه	۱-۶۰-۱۴۶
۳	اردبیل	۱-۶۰-۲۲۰
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

از پنج رقم افتراقی نخود: ILC۱۹۲۹، ILC۵۹۲۸، ILC۲۵۰۶، ILC۳۲۷۹ و ILC۷۲ در محیط مایع غذایی هوگلند استفاده شد. برای حذف پتاسیم از محیط غذایی، به جای KNO_3 از NH_4NO_3 به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، و نیز به جای KH_2PO_4 از NaH_2PO_4 به میزان ۱۵۶ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد، ولی برای ارقام شاهد این حذف صورت نگرفت.

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

زمانی مناسب انجام گردید. مایه‌زنی قارچ عامل بیماری و یادداشت‌برداری علایم مانند روش‌های ذکر شدهٔ پیشین صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی

بررسی ژنومی پاتوتیپ‌ها

سه نمونهٔ مورد آزمایش در روش RAPD-PCR، در باندهای ۱۴۴۴bp، ۳۶۸، ۳۱۵، ۳۱۲ و ۱۴۱ هیچ گونه باندی ندادند (شکل ۱)، و در بررسی تشابهات باندی، با استفاده از ضریب تشابه نئی دو نمونه از نظر آغازگر ۱۷۱ تا میزان ۸۰ درصد به یکدیگر شبیه بودند (جداول ۳، ۴ و ۵).

اندازه‌گیری میزان یون‌های پتاسیم و سدیم

در ارقام مایه‌زنی نشده شیب بسیار ضعیفی در میزان یون‌های سدیم و پتاسیم مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳)، در حالی که در ارقام مایه‌زنی شده این شیب در ارقام حساس ILC۱۹۲۹ در مقایسه با رقم مقاوم ILC۵۹۲۸ شدیدتر بود (شکل‌های ۴ و ۵).

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

بررسی واکنش ارقام بومی

حساسیت و مقاومت نسبت به پاتوتیپ ۴ به ترتیب در ارقام ۲۲۴-۶۰-۱ و ۱۴۴-۶۰-۱ دیده شد، و ارقام ۱۴۶-۶۰-۱، ILC۸۵، ۳۱-۶۰-۱۲، ۱۱-۶۰-۱۲ و ۱۰۱۰۵-۰۷۱-۱۲ متحمل بودند. نسبت به پاتوتیپ ۶، رقم ۱۴۴-۶۰-۱ در مرحلهٔ گیاهچه‌ای پایدار و در مرحلهٔ بلوغ متحمل شناخته شد، و در دیگر ارقام پایداری یا تحمل در هر دو مرحله مشاهده نگردید (جدول ۶).

بررسی تأثیر تنش نبود پتاسیم

از آن جا که در نتیجهٔ نبود پتاسیم در محیط غذایی رشد گیاه پس از مدتی متوقف می‌گردد، بررسی فوق تنها در مرحلهٔ گیاهچه‌ای در پنج رقم افتراقی یاد شده انجام گرفت، و در نوع واکنش پایداری این ارقام در تیمارهای دارای پتاسیم و بدون آن تغییری دیده نشد. ولی از لحاظ درجهٔ واکنش ارقام در حدود ۱-۲ 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 ونرینن 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 ۰/۴ کاهش بیماری را بهبود بخشد، در نتیجهٔ تأثیر ۹ ژن مستقل پایداری، درجه واکنش به میزان ۸ درجه از مقیاس ۱-۹ ردی و نن کاسته می‌شود. در نتیجه درجهٔ واکنش برابر با ۱ (مصونیت) خواهد بود، و برعکس با وجود ۹ ژن مستقل حساسیت، با افزایش ۸ درجه در مقیاس فوق (۹=۸+۱) حساسیت کامل (مرگ گیاه) به وجود خواهد آمد. در رقم افتراقی و پایدار ILC۵۹۲۸ درجهٔ واکنش ۲ نشان دهنده کاهش درجه واکنش بیماری به میزان ۷ درجه است (۰/۴÷۷) که به طور میانگین ۱۸ آلل پایداری را شامل می‌شود. بنابراین، در بروز پایداری این رقم، ۹ ژن اصلی و

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

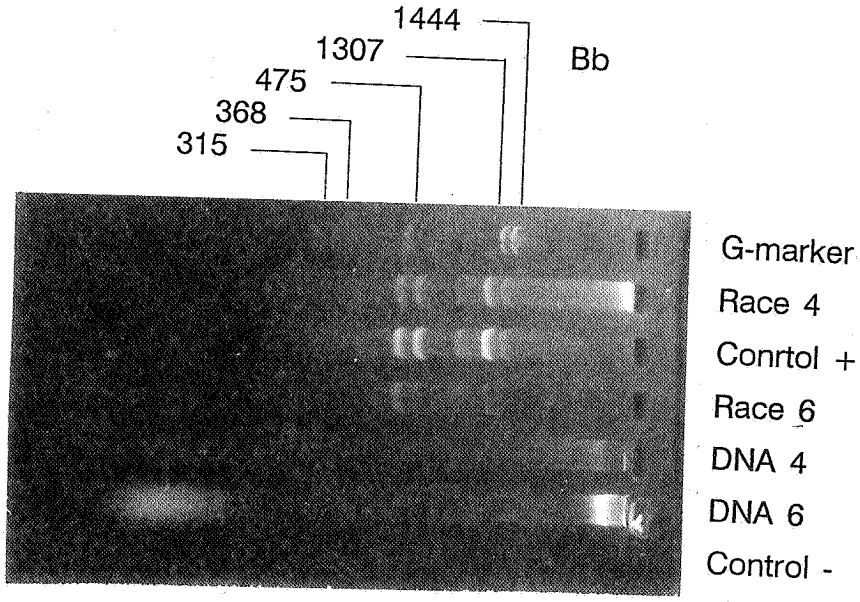
[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

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

پاتوتیپ ۶	شاهد مثبت	پاتوتیپ ۴	مارکر CG	bp
–	–	–	۱۴	۱۴۴۴
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۳۰۷
۱۷	–	۱۷	–	–
–	۱۸	–	–	–
–	–	۱۹	–	–
–	۲۰	–	–	–
–	۴۴	۲۴	–	–
۲۵	–	–	۲۵	۴۷۵
–	–	۲۶	–	–
۲۷	۲۷	–	–	–
–	–	–	۳۳/۵	۳۶۸
–	–	–	۳۵/۲	۳۱۵
–	–	–	–	۳۱۲
–	–	–	–	۱۴۱

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

	اندازه حرکت باندها برحسب میلی‌متر								
نمونه‌ها	۱۵	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷
پاتوتیپ ۴	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۰
پاتوتیپ ۶	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱
شاهد مثبت	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۱



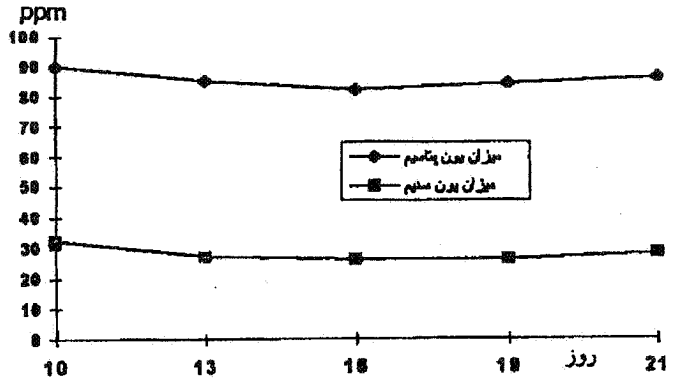
شکل ۱. باندهای ژنومی پاتوتیپ‌ها در روش PCR

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

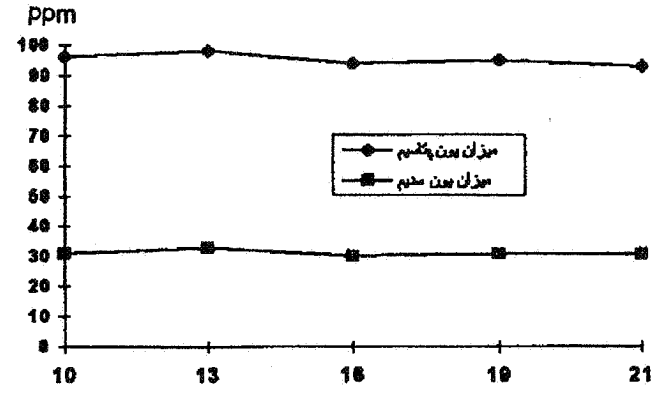
[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

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

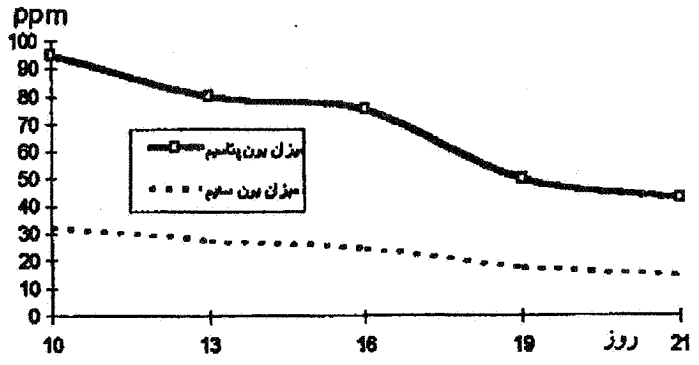
پاتوتیپ‌ها	۴	۶	شاهد
۴	۱	۰/۸	۰/۶۷
۶	۰/۸	۱	۰/۸
شاهد	۰/۶۷	۰/۸	۱



شکل ۲. تغییر غلظت الکترولیت‌ها در رقم تلقیح نشده و حساس ILC۱۹۲۹



شکل ۳. تغییر غلظت الکترولیت‌ها در رقم تلقیح نشده و پایدار ILC۵۹۲۸



شکل ۴. تغییر غلظت الکترولیت‌ها در رقم تلقیح شده و حساس ILC۱۹۲۹

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

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

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

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

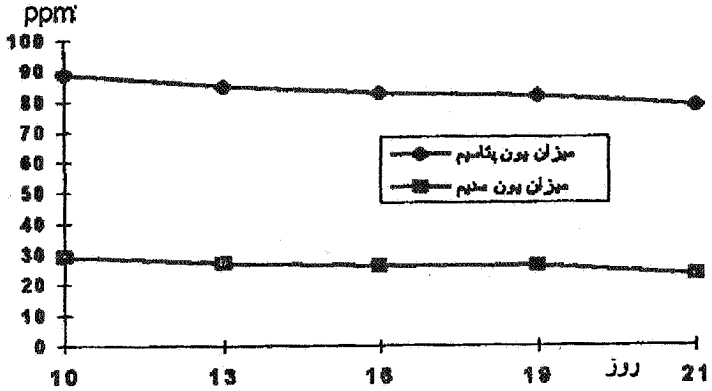
جدول ۷. درجه واکنش و نوع واکنش پایداری ارقام افتراقی نسبت به پاتوتیپ‌ها در برابر تنش پتاسیم

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

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]



شکل ۵. تغییر غلظت الکترولیت‌ها در رقم تلقیح شده و پایدار ILC۵۹۲۸

مستقل دخالت دارند. وجود چنین پایداری در برابر پاتوتیپ ۶، که تاکنون رقم کاملاً پایداری در برابر آن شناخته نشده است، نشان دهندهٔ پایداری زیاد این رقم است، و برعکس در رقم حساس ILC۱۹۲۹، درجهٔ واکنش ۷/۸ نشان دهندهٔ افزایش ۷/۸ در درجه واکنش است (۱۹/۵=۰/۴÷۷/۸)، که به طور میانگین ۲۰ آلل حساسیت را شامل می‌شود.

در بررسی پایداری ارقام بومی، در رقم پایدار ۱۴۴-۶۰-۱ که 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 ۲/۳، به طور میانگین ۱۶/۷۵ 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 ۴/۷، 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 میزبان قادر به شناسایی بیمارگر باشد. در غیر این صورت، یا قادر به شناسایی هیچ یک از فراورده‌های ژنی بیمارگر نیست، یا تنها شماری از آنها را شناسایی می‌کند. یکی از راه‌های شناخت میزان فعالیت‌های این چنینی، سنجش میزان الکترولیت‌ها 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 میزبان به عفونت‌های حاصل از عوامل بیماری‌زا، زهرابه‌های اختصاصی و غیر اختصاصی میزبان، آنزیم‌های بیمارگر و برخی مواد سمی است، از دست رفتن الکترولیت‌ها 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 ILC۱۹۲۹ شیب نزولی میزان الکترولیت‌ها، به ویژه پتاسیم شدیدتر است، و بنا بر اصل سازگاری بیمارگر-گیاه میزبان در مورد گیاهان حساس چنین نتیجه‌ای منطقی به نظر می‌رسد. در گیاه پایدار ILC۵۹۲۸ برهمکنش به وجود آمده به صورت ناسازگاری است، و شیب کاهش الکترولیت‌ها 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 مختصری در کاهش این یون‌ها دیده

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

می‌شود.

در بررسی پایداری ارقام افتراقی با استفاده از محیط غذایی هوگلند، نبود پتاسیم موجب تحریک گیاه به تولید پیوترسین می‌گردد، و نتیجه آن به صورت آغاز یک رشته فعالیت سلولی در گیاه و تقویت سدهای دفاعی و محدودکننده، پس از حمله بیمارگر است. در نتیجهٔ کاهش یون پتاسیم، مقدار پیوترسین و فعالیت دی‌آمین اکسیداز افزایش می‌یابد. هر دو این ترکیبات در محافظت گیاه به هنگام تنش نقش دارند. هر چند مسئله شناسایی بیمارگر برای گیاه اهمیت دارد، ولی در این جا در نتیجه کاهش پتاسیم، 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 چوب‌پنبه و ترشح لیگنین در اطراف محل آسیب دیده می‌گردد.

همان طوری که از نتایج آزمایش برمی‌آید، هر یک از ارقام با کاهش حدود ۱-۲ 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 آلودگی به همراه دارد. لازم به یادآوری است که کاهش پایداری رقم پایدار ILC۵۹۲۸ از درجه ۲ به ۳، می‌تواند ناشی از ضعف نسبی گیاه در تنش ناشی از نبود پتاسیم باشد.

ب) ماهیت ژنتیکی بیمارگر

خنثی‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه میزبان نتیجه وجود ژن‌های گوناگون بیماری‌زایی است. کاورت و همکاران (۴) چهار ژن MAK را به عنوان ژن‌های مؤثر در تجزیه فیتوآلکسین ماکیان‌نخود 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 بیماری‌زایی بیمارگر می‌توانند سبب تفاوت ژنوم 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 ۸-۳ نوکلئوتیدی و RFLP، می‌توان ژنوتیپ‌های بسیاری را در میان جدایه‌های مناطق گوناگون به دست آورد، که شناسایی پاتوتیپ‌ها را دقیق‌تر می‌نماید.

منابع مورد استفاده

۱. نوراللهی، ح.، م. فلاحتی رستگار و ب. جعفرپور. ۱۹۷۹. تشخیص نژادهای فیزیولوژیک *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. Infatino 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.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]

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 Numbero 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.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.17.8]