بررسی فعالیت پلی گالاکتوروناز ی و تنوع ژنتیکی ۴۲ جدایه ایرانی قارچ *Ascochyta rabiei*

اباصلت حسین‌زاده کلاگر: دانشگاه مازندران
محمد رضا زمانی، مصطفی مطلبی: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

چکیده

«آسکوشیتا ربیی[1]» یکی از پاتوژن‌های مخرب قارچی مزارع نخود ایرانی(*Cicer arietinum L.*) است. در تحقیق حاضر ۴۲جدایه ایرانی قارچ ا.ربیی[2] شامل جدایه‌هایی با شدت بیماری‌زایی زیاد[3]، کم[4] و متوسط[5] ، که قبلا پژوهش بیماری‌زایی آن‌ها انجام شد، مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم پلی گالاکتوروناز یکی از فاکتورهای مهم در شروع بیماری برق‌زدگی است. بنا بر این قارچ‌ها در محیط کشت مایع PZ[6] (pH=4.5) به مدت ٦ روز کشت شدند. حضور آنزیم پلی گالاکتورونازدرمحیط کشت بعد از استخراج، با استفاد ه از تست پلیت مورد تایید قرار گرفت سپس فعالیت PG با استفاده از روش کالمر تعیین شد. دسته بندی جدایه‌ها براساس فعالیت PG با استفاده از روش UPGMA[7] انجام شد. نتایج نشان داد با تعیین فعالیت PG می‌توان جدایه‌های HV و WV هر استان را متمایز ساخت. در بررسی دیگر، استخراج DNA به روش دلاپورتا از میسلیوم انجام شد. سپس واکنش RAPD (چند شکلی تکثیر شده تصادفی DNA) با استفاده از ۱۲ پرایمر تصادفی ۹- ۱۰ نوکلئوتیدی صورت گرفت. پلی مورفیسم DNA در محصولاتPCR جدایه‌ها با استفاده از روش UPGMA بررسی شد. نتایج نشان داد تکثیر DNA با استفاده از دو پرایمر *Ar*082 و *Ar*171 دارای بالاترین الگوی پلی مورفیک است. از سوی دیگر، اگرچه تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های ا.ربیی قابل توجه است، اما الگوی پلی‌مورفیک این پرایمرها نمی‌تواند جدایه‌های HV را از WV متمایز نماید.

مقدمه

بیماری برق‌زدگی نخود[8] در غرب آسیا و شمال‌غربی آفریقا به خاطر شرایط اقلیمی ویژه، از بیماری‌های شایع است[۱۹]. منطقه غرب و شمال غربی ایران به ترتیب با داشتن بیش از ۳٦۰ و ۹۰ هزار هکتار به عنوان یک منطقه استراتژیک در کشت نخود است. حالت اپیدمی این بیماری بذرزاد[۱۰] در برخی از مناطق آن (ازجمله استان کرمانشاه در سال ۱۳۷۵) گزارش شده است[۱]. دیواره سلولی گیاه یک شبکه پلیمری از سلولز،

۱-Ascochyta rabiei ۲-A.rabiei ۳-Highly virulent/HV ٤-Weakly virulent/WV ٥-Moderate virulent/MV ٦-Pectic Zymogram ۷-Unweighted pair grouped method by arithmatic average ۸-Ascochyta blight

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

همی سلولز، مواد پکتینی و پروتئین است[۱٦].بسیاری از پاتوژن‌های گیاهی جهت ورود به گیاه و نفوذ به بافت‌های مختلف آن، آنزیم‌هایی را به منظور تخریب ترکیبات دیواره سلولی گیاه تولید می‌کنند[٦]. گزارشات متعددی نشان می‌دهد اولین واکنش ملکولی بین پاتوژن و میزبان در پروسه‌های بیماری‌زایی، اثر آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی میزبان است. در این فرآیند، این آنزیم‌ها پلی ساکاریدهای دیواره سلولی گیاه را تجزیه و تخریب می‌کنند[٦]، [۲۳] و [۲٦]. همچنین بتمن[۱] و ساشمن[۲] در سال ۱۹۷۶[٦] گزارش دادند که تنها آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی که دربیماری‌زایی دخالت دارند، آنزیم‌های تجزیه کننده مواد پکتینی هستند. این آنزیم‌ها معمولاً ترشحی هستند و به صورت ایزوآنزیم‌های مختلفی تولید می‌شوند که از نظر اندازه، بار الکتریکی، پایداری و توانایی برای تخریب دیواره‌های سلول مختلف هستند[۲٦]. آنزیم‌های پکتیکی پیوند α-۱و ٤ بین واحدهای سازنده پکتین را می‌شکنند و در فرآیند تجزیه(Maceration) تدریجی و مرگ بافت گیاهی اهمیت دارند[۲۲]. تعدادی باکتری و قارچ بیماری‌زای گیاهی شناخته شده‌اند که آنزیم‌های پکتینی تجزیه کننده بافت‌های میزبان را تولید می‌کنند[۳]، [٦] و [۱۲].

تکنیکRAPD[۳] که در سال ۱۹۹۰ دو گروه تحقیقاتی، به طور همزمان و مستقل از یکدیگر آن را ابداع و معرفی کرده بودند[۱۱] و [۱٥] نوعی از تکنیک PCR[٤] است که به اطلاعات اولیه در خصوص توالی بازی DNA ارگانیسم جهت طراحی و ساخت آغازگرها نیاز ندارد. پژوهندگان با استفاده از پلی مورفیسم DNA حاصل ازRAPD به بررسی تنوع ژنتیکی موجودات، شناسایی و دسته‌بندی سریع آن‌ها می‌پردازند[۲]، [۷]، [۱۸]،[۲٤] و [۲٥]. به خاطر ویژگی‌های فوق و نامتجانس بودن آسکوشیتا ریبی از نظر شدت بیماری‌زایی[۹] خصوصیات مورفولوژیک و کشت[۸]، [۱۳] و [۲۸] برای اولین بار فیشر و همکاران (۱۹۹٥) [٥]، به کمک RAPD توانسته‌اند تعداد ۳۰ جدایه ا. ریبی را که از مناطق مختلف ایتالیا جمع‌آوری شده بودند تجزیه کلاستر و آن‌ها را دسته‌بندی کنند.

در این تحقیق، دسته‌بندی مولکولی جدایه‌های مختلف قارچ ا. ریبی از نظر میزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و الگوی پلی مورفیسمDNA حاصل از تکنیک RAPD بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد٤۲ جدایه قارچ ا.ریبی از بین جدایه‌های مختلف استان‌های کرمانشاه، لرستان، استان‌های آذربایجان غربی و شرقی که به ترتیب با علامت‌های اختصاری IK، IL، IE و IW نشان داده شدند انتخاب گردید. انتخاب اولیه این جدایه‌ها بر اساس اختلاف ظاهری سطح کلنی(مضرس بودن حاشیه کلنی، سرعت رشد روی محیط کشت)

۱-Bateman ۲-Sashman ۳-Random Amplified Polymorphic DNA
٤-Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

صورت گرفت. برای بررسی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه‌های مختلف قارچ در محیط کشت مایع PZ (pH=4.5) در حالت شیکینگ[۱] و شرایط دمایی ۱± ۲۲درجه سانتی‌گراد، به مدت شش روزدر سه تکرار کشت داده شدند. فعالیت آنزیم‌های پکتیکی با روش تست پلیت[۲] تائید شد. به این منظور ۵ میکرولیتر از محیط کشت شش روزه PZ مایع روی سطح پلیت که حاوی سوبسترای آنزیم‌های پکتیکی و ماده زمینه آگارز بود، قرار گرفت. نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه و سپس با روتریوم قرمز[۳] ۰/۲% رنگ آمیزی شدند[۲۰]. میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (PG) توسط اندازه‌گیری محصول ایجاد شده درمخلوط واکنش با معرف مس[٤] و معرف آرسنو مولیبدات بر اساس روش کالمر و همکارانش(۱۹۸۸) [٤] در سه تکرار محاسبه شد.

برای انجام RAPD ابتدا DNA ژنومی جدایه‌های مختلف قارچ به روش دلاپورتا (۱۹۹۵)[۲۷] استخراج گردید و بعد از بهینه‌سازی پارامترهای مؤثردرRAPD واکنش PCR با استفاده از ۱۲ اولیگومر ۹-۱۰ نوکلئوتیدی (جدول۱) در دمای اتصال ۳۲ درجه سانتی‌گراد، در ۳٤ سیکل صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲% در شرایط کاملاً یکسان بر اساس دستورالعمل سمبروک و همکارانش (۲۰۰۱)[۱٤] الکتروفورز شد. سپس تجزیه کلاستر به روش UPGMA با برنامه SPSS بر اساس ماتریس فاصله الگوی چند شکلی DNA محصولاتRAPD مربوط به آغازگرهای *Ar*082 و *Ar*171 صورت گرفت.

جدول۱. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و تعداد پلی مورفیسم باندی مشاهده شده در محصولات PCR جدایه‌های مختلف قارچ *A. rabiei*

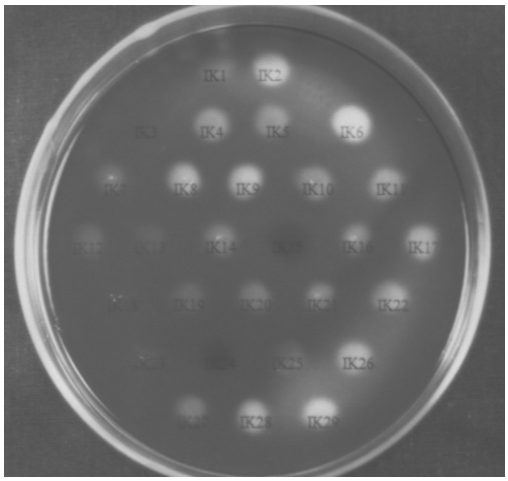
نام	جهت پرایمر '3→ '5	تعداد نوکلئوتید	تعداد پلی‌مورفیسم باندی
*Ar*079	5'-GAAAGAGCGG-3'	10	8
*Ar*081	5'-ACGGTCTTGG-3'	10	8
*Ar*082	5'-ACGATCGCGG-3'	10	9
*Ar*171	5'-GAAACAGCGG-3'	10	9
*Ar*172	5′-GGAGCCCAC-3′	9	6
*Ar*173	5′-GGAGGGTGTT-3′	10	7
*Ar*174	5′-ACGATCGCGG-3′	10	8
*Ar*PU1	5′-ACTGGGACTC-3′	10	7
*Ar*PU2	5′-AGATGCAGCC-3′	10	6
*Ar*PU3	5′-ACTGGGACTC -3′	10	5
*Ar*0R1	5′-CGGCCACCCT-3′	10	7
*Ar*0R2	5′-CGCGTGCCAG-3′	10	6

۱-Shaking ۲-Test plate ۳-Ruthenium red ٤-Cooper reagent

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

نتایج و بحث

مواد پکتیکی که اساساً در تیغه میانی و دیواره اولیه سلول‌های گیاهی وجود دارند[۱۶] نسبت به تجزیه و تخریب آنزیم‌های پکتیکی حساسیت ویژه‌ای دارند[٤]. آنزیم‌های پکتیکی مختلف به روش‌های گوناگون ترکیبات پکتیکی تیغه میانی و دیواره اولیه سلول‌های گیاهان را تجزیه و تخریب می‌کنند[۲۹]. توانایی پاتوژن‌های گیاهی برای تولید آنزیم‌هایی که پلی ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه می‌کنند احتمالاً اولین مرحله در فرآیند بیماری‌زایی است[۲۹]. تعداد ٤۲ جدایه ا.ریبی که بررسی شدت بیماری‌زایی آن‌ها قبلا انجام شد و در سه دسته شدت بیماری‌زایی زیاد شامل جدایه‌های IK08، IK04، IE06، IE04، IL10، IL01، IK17، IK14، IK13 و IK10 ، کم شامل جدایه‌های IL06، IL04، IE08، IE01، IK15، IK06 و IK03 و دیگر جدایه‌ها در گروه بیماری‌زای متوسط دسته‌بندی شدند[۱۷]، [۲۱]. جدایه‌ها از نظر تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز بررسی شدند. نتیجه بررسی مقدماتی فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به‌روش تست پلیت نشان داد که تمام جدایه‌های بررسی شده توانایی تولید آنزیم PG را دارند(شکل۱).



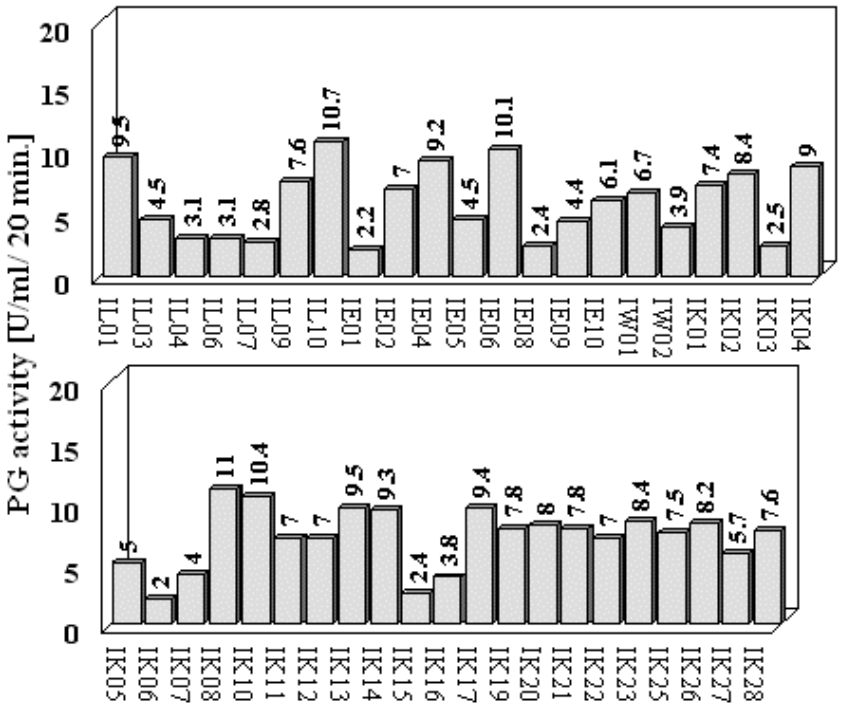
شکل۱. نتایج مربوط به Test plate، نواحی بی‌رنگ نشان‌دهنده فعالیت آنزیمPG و شماره‌ها مربوط به جدایه‌های مختلف قارچ ا.ریبی است

فعالیت آنزیم PG جدایه‌ها تعیین شد. نتیجه حاصل از بررسی مقادیر اندازه‌گیری شده فعالیت PG در هیستوگرام شکل ۲ نشان داد که این جدایه‌ها در تولید آنزیمPG اختلاف معنی‌داری در سطح $P<0.05$ در تست دانکن با هم داشته‌اند.

به منظور مقایسه نتایج فعالیت آنزیمPG با نتایج تست بیماری‌زایی که قبلاً در شرایط آزمایشگاهی تعیین شده بودند[۲۱]، تجزیه کلاستر به روشUPGMA با استفاده از برنامه SPSS انجام شد. گروه‌های کلاستری با استفاده از تابع تشخیص مورد تأیید قرار گرفت(شکل۳). نتایج نشان داد که در سطح٤/٥ جدایه‌های استان

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

کرمانشاه به چهار گروه، لرستان به سه گروه و آذربایجان به چهار گروه دسته‌بندی شدند. مقایسه دسته‌بندی فعالیت آنزیم PG این جدایه‌ها با گروه‌بندی به دست آمده از شدت بیماری‌زایی، نشان داد که جدایه‌های HV و WV هر استان در گروه‌های کلاستری کاملاً مجزا از هم قرار گرفته‌اند.

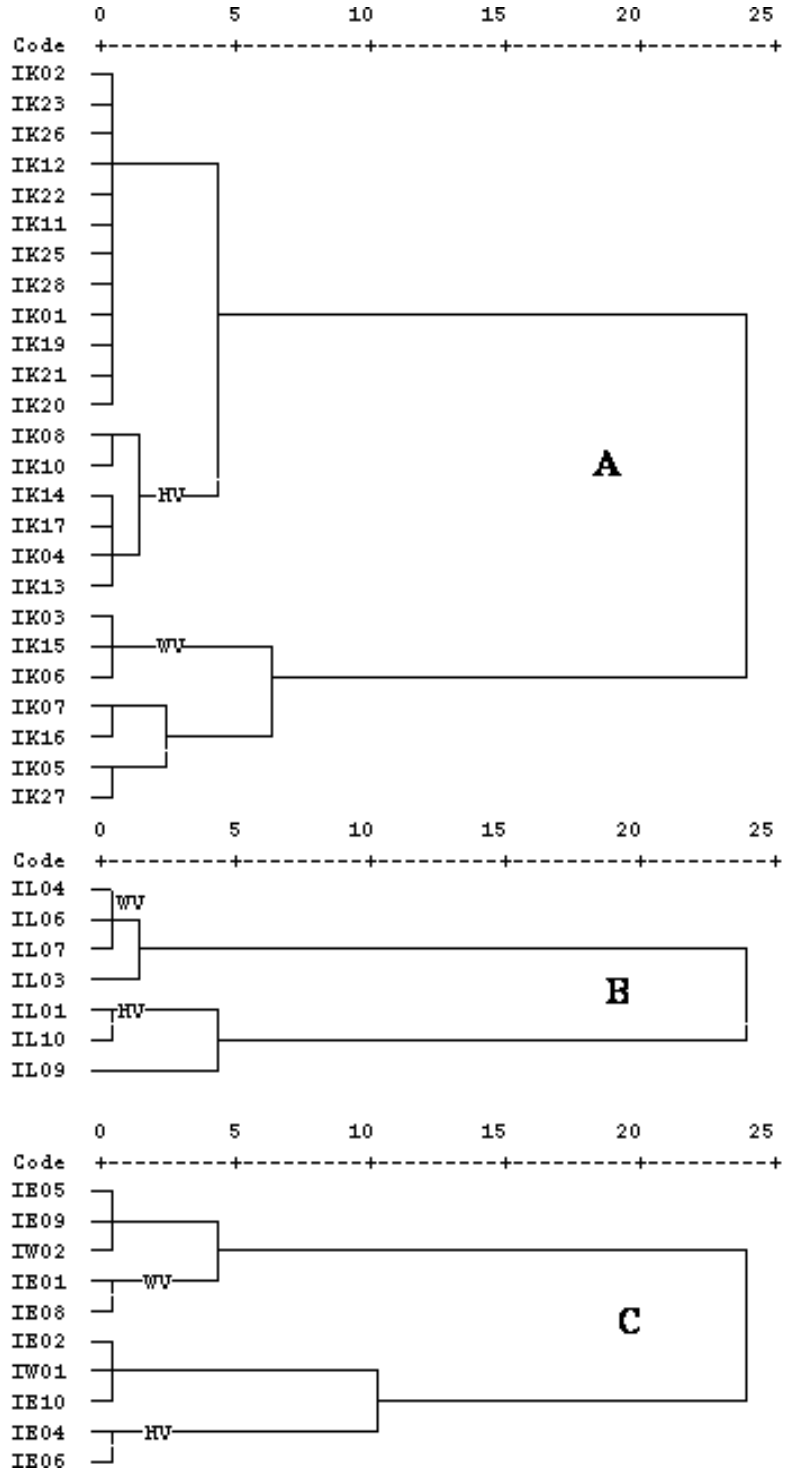


شکل۲. فعالیت پلی گالاکتورونازی جدایه‌های مختلف قارچ ا.ربیی
اعداد روی هیستوگرام میانگین‌ها هستند که در سطح $P<0.05$ اختلاف معنی‌دار است

تنوع ژنتیکی جدایه‌های فوق با استفاده از RAPD بررسی شد. تحت شرایط بهینه‌سازی یکسان PCR، PCR انجام شد. نتایج نشان داد پلی‌مورفیسم DNA، در جدایه‌های مختلف قارچ ا. ربیی بین ٥- ٩ قطعه ذکر شده برای هر پرایمر است(جدول۱) و دو پرایمر *Ar*082 و *Ar*171 دارای بیش‌ترین پلی‌مورفیسم باندی هستند.

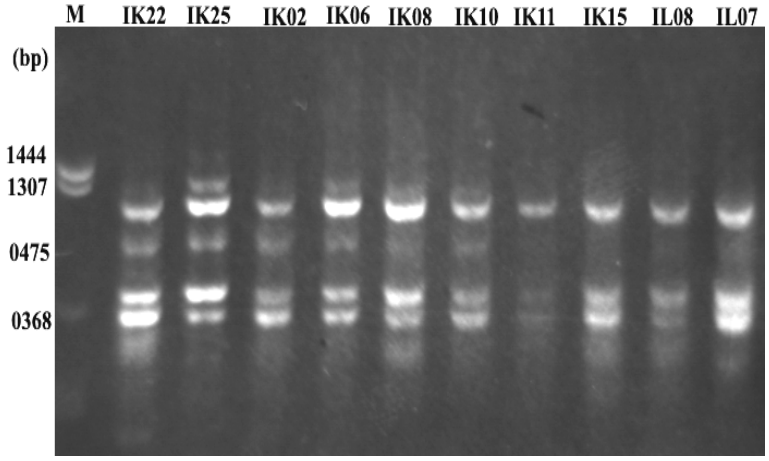
تنوع ژنتیکی با تشکیل ماتریکس صفر و یک و تجزیه کلاستر به روش UPGMA نشان داد که جدایه‌های جمع آوری شده از استان‌های مختلف دارای تنوع ژنتیکی زیادی هستند(شکل‌های ٤ و ٥). مقایسه دندروگرام‌های حاصل نشان داد که ارتباطی بین الگوی پلی مورفیسم DNA حاصل از ۱۲ پرایمر با قدرت بیماری‌زایی و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونازی وجود ندارد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

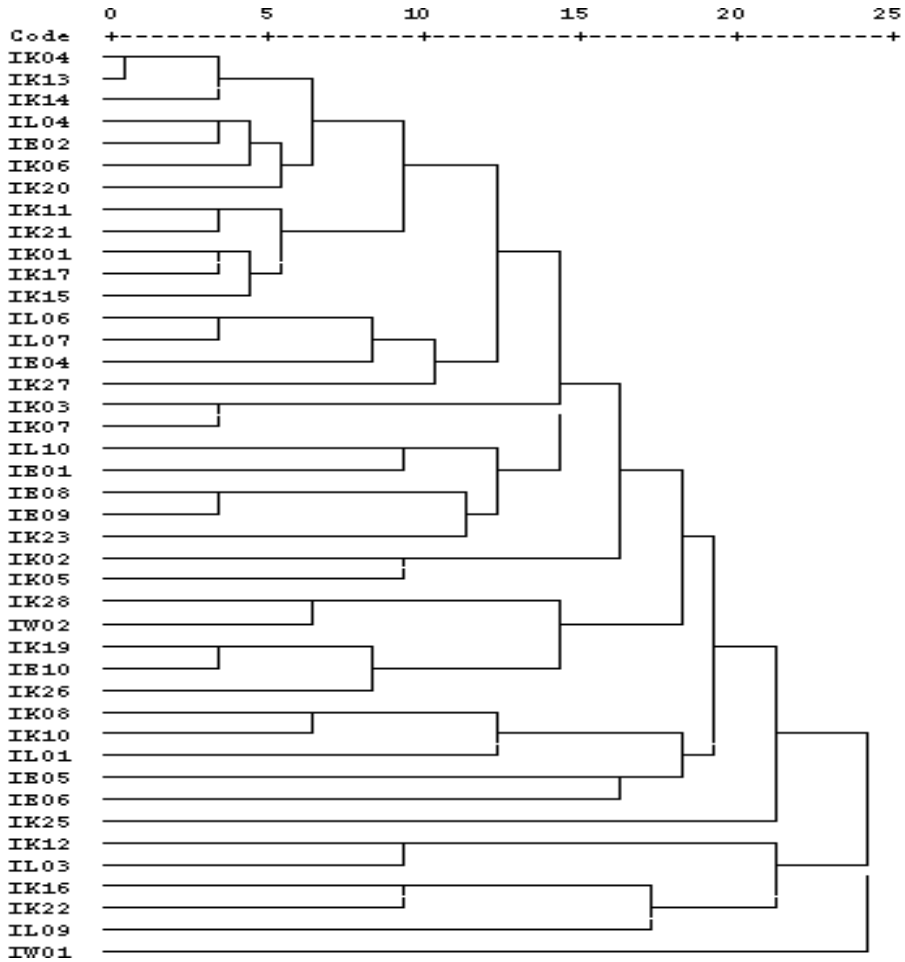


شکل۳. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس میزان فعالیت پلی گالاکتورونازی جدایه‌های مختلف قارچ اریبی استان کرمانشاه(IK)، استان لرستان (IL)، استان آذربایجان غربی (IW) و استان آذربایجان شرقی (IE). به گروه‌های WV و HV هر استان توجه شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]



شکل٤. محصولات واکنش RAPD برخی ار جدایه‌های قارچ ا.ریبی با استفاده از پرایمر *Ar*082



شکل٥. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس محصولات RAPD جدایه‌های مختلف قارچ ا.ریبی با پرایمرهای *Ar*082 و *Ar*171

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

منابع

۱. آمارنامه کشاورزی اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی ایران. شماره ۷۷/۰۱ تهران، (۱۳۷۷).

2. A. Abo-elwaf and K. Murai, Intra and inter specific variations in lens revealed by RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 90 (1995) 335-340.

3. A. Alana, A. Gabilondo, F. Hernando, J. B. Dominguez, M. Liama, J. L. Serra, Pectin lyase Production by a *Penicillium italicum* Strain. Applied and Enviromental Microbiology, 55 (1989) 1612-1616.

4. A. Collmer, Pectic enzymes and bacterial invasion of plants. In: Plant-Microbe Interactions - Molecular and Genetic Perspectives, Vol. 2. T. Kosuge and E.W. Nester (eds.), Macmillan Publishing Co., New York, (1986) 253-284.

5. C.Fischer, A. Porta-Puglia, W. Barz, RAPD Analysis of Pathogenic Variability in *Ascochyta rabiei.* Journal Phytopathology, 143 (1995) 601-607.

6. D. F. Bateman and H. G. Basham, Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes, *in*: Encyclopedia of Plant Pahgiology, New Series, Vol. 4, Physiological Planbt Pathology (R. Heitefuss, and P.H. Williams, eds.), Springer-Verlag, New York, (1976) 316-355

7. D. M. Spooner, J. Tivang, J. Nienhuis, J. T. Miller, D. S. Douches and M. A. Contreras, Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Eutuberosum* (subgenus *Potatoe*). Theoretical and Applied Genetics, 92 (1996) 532-540.

8. G. Singh, Identification and designation of physiology races of *Ascochyta rabiei* in India. Indian Phytopathology, 1(1990) 48-52.

9. H. Jan and M. V. Wiese, Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting in the palouose. Plant Disease, 75(1991) 904-906.

10. J. C. Luthra and K. S. Bedi, Some preliminary studies on gram blight with references to its cause and mode of perennation. Indian Journal Agriculture Science, 2 (1932) 449-515.

11. J. G. Williams and A. R. Kubelik, DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18 (1990) 6531-6535.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

12. J. P. Keon, R. M. Cooper, R. J. W. Byrde, Some aspects of Fungal enzymes that degrade plant cell walls .in Fungal Infection of Plants. Cambridge University Perss, (1987) 133-157.
13. J. S. Grewal, Evidence of Physiologic Races in *Ascochyta rabiei* of Chick-pea, (1984)55-65.
14. J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular cloning: A laboratory manual, (3rd Edition/3 Vol. Set), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (2001)
15. J. Welsh and M. M. Cleland, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18(1991) 7213-7218.
16. M. McNeil, A. G. Dravill, S. C. Fry, P. Albersheim, Structure and function of the primary cell wall of plants. Annual Review Biochemistry, 53 (1984) 625-633.
17. M. Motallebi, M.R. Zamani, A. Hosseinzadeh Colagar, Relationship of between polygalactu -ronase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. Isfahan University of Technology, 6 (2003) 159-169.
18. M. Ragot and H. Hoisington, Molecular markers for plant breeding: Comparision of RFLP & RAPD genotyping costs. Theoretical and Applied Genetics, 83 (1993) 975-984.
19. M. T. Mmbaga, Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and Ascochyta blight resistance in Chickpea. In "Application of DNA fingerprinting for crop important marker- assissted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas, 11-12 April 1994", pp. 23-37, ICARDA, Aleppo, Syria, (1997).
20. M.R. Zamani and P. A. O'brien, Study of pectic enzymes in *Rhyzoctonia solani* AG-8. Combined Biological Sciences Meeting, (1993).
21. M.R. Zamani, M. Motallebi, A. Hosseinzadeh Colagar, In vitro pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on chickpea roots. The 10th Iranian Biology conference, Shiraz, (2001) 43- 47
22. N. Lisker, J. Katan, Y. Henis, Sequential production of polygalacturonase, cellulase and pectinlyase by *Rgizoctonia solani*. Canadian Journal of Microbiology, 21 (1975) 1298-1304.
23. O. Mikes, J. Sedlackkova, L. Roxava-Benkova, High performance Liquid Chromatography of Pectic enzyme. Journal of Chromatography, 207(1981) 99-114.
24. P. C. Sharma, Abundance and polymorphism of di- , tri- and tetranucleotide tandem repeats in chick-pea. Theorical and Applied Genetic, 90 (1992) 90-96.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]

25. R. B. Waugh, The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. Plant Cell Report, 11 (1992) 466 - 469.

26. R. M. Cooper, The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. *In* J.A. Callow (ed.) Biochemical plant pathology. Wiley and Sons, Chichester, England, (1983) 101-136

27. S.L. Dellaporta, A plant minipreparation. Plant Molecular Biology Research, 1 (1983)19-21.

28. S. S. Aujla, Study on eleven Isolates of *Phylotica rabiei (Pass.)* Trot., The Causal agent of gram blight in Punjab. Indian Phytopathology, 17 (1964) 83-87.

29. W. Pilnik and A.G.J. Voragen, The Significance of Endogenous and Exogenous Pectic Enzyme in Fruit and Vegetable Processing, In P.F. Fox (ed.). Food Enzymology. Elserier Science Publishers, Amsterdam, (1991) 330-336

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-03]