مطالعه تنوع درون گروهی آناستوموز AG-2 قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn جدا شده از گیاه چمن (*Lolium perenne* L.) با استفاده از نشانگر پکتیک زایموگرم (Pectic zymogram)

غلامرضا بلالی و زهره محربی

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۳/۲۵

چکیده

گونه *Rhizoctonia solani*، یکی از متنوع‌ترین و پیچیده ترین گونه‌های قارچی بوده و از نظر مقایسه ریخت‌شناسی شبیه قارچهای ناقص بازیدیومیست است. دامنه میزبانی وسیع و فقدان صفات تشخیصی در آن، مطالعات ژنتیکی وتاکسونومیکی (آرایه شناختی) جمعیتهای این قارچ را با مشکل مواجه ساخته است. در این مطالعه زایموگرم آنزیم پکتیناز بعنوان یک نشانگر مولکولی برای مطالعه تنوع ژنتیکی آناستوموز گروه۲ (AG-2) قارچ *R. solani*، که عامل بیماری لکه قهوه ای چمن، مورد استفاده قرار گرفت. در این رابطه ۲۵٦ جدایه بر اساس واکنش آناستوموز ریسه و وجود هسته‌های متعدد در هر سلول بعنوان گروه آناستوموزی AG-2 شناسایی شد. زایموگرافی این تعداد جدایه دو لوکوس، یکی برای پلی‌گالاکتوروناز و دیگری برای پکتین‌استراز مشخص نمود، که بر اساس پلی مورفیسم این دو لوکوس تعداد ۱۰ گروه زایموگرم برای ایزوله های قارچ *R. solani* بدست آمد. بنظر می رسد این روش نه تنها در شناسایی گروههای آناستوموزی قابل استفاده است بلکه در تعیین تنوع ژنتیکی درون گروهی نیز اطلاعات مفیدی ارائه میدهد که این اطلاعات می تواند در مطالعه اپیدمیولوژی این قارچ مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پکتیک‌زایموگرم ,*Rhizoctonia solani*, AG-2

مقدمه

سرده (جنس)*Rhizoctonia* یکی از بزرگترین، متنوع ترین و پیچیده ترین گروه های قـارچی بازیدیومیست است (۸ سرده) که کنیدی تولید نمی کند و به لحاظ رویشی از بقیه تاکسونهای قارچهای ناقص متمایز می شود(۲۰). این سرده (جنس) در سال ۱۸۱۵ توسط دکاندول (de Candolle) و گونهٔ *Rhizoctonia solani* توسط Kuhn در سال ۱۸۵۸ نامگذاری شـد. ویـژگی این سرده (جـنس)، تولید ریـسه‌های یک شکل از اسکلروت، چسبیدن به ریشه گیاه زنده، ایجاد بیماری، و همچنین نا توانی درتولید اسپور است (۸،۲٤).

قارچ *R. solani* ممکن است عامل بیماری بسیاری از گیاهان باشد یا بصورت ساپروفیت در خاک زندگی کند، و یا به فرم میکوریزی با گیاهان خانواده ارکیده (*Orchidaceae*) همزیست شود (۲۰). *R. solani* دامنه وسیعی از نژادهای بیماریزا را دارد، برخی فقط محدود به یک گونه میزبان می‌شوند و برخی دیگر دامنه وسیعی از میزبانهای متعدد را دارا هستند. برخی از گروههای آناستوموزی چون AG-1، AG-2، AG-3 و AG-4 در سراسر دنیا گزارش شده‌اند (۲۰) در حالیکه چگونگی پراکندگی سایر گروهها، کمتر متداول، کاملاً بررسی نشده است. جدایه‌های AG-1 بیشتر از گونه‌های گیاهان خانواده

Archive of SID
www.SID.ir

نخود *Fabaceae* و گندمیان *Poaceae* بدست آمده‌اند. AG 2-1 از خانواده شب‌بو *Brassicaceae*، AG 2-2 از خانواده‌های اسفناج *Chenopodiaceae*، نخود *Fabaceae* و سیب‌زمینی *Solanaceae*، AG-4 از تعداد زیادی از گیاهان زراعی چون لوبیا، چغندرقند، سویا، پنبه و کتان، AG-5 از خاک و خانواده *Fabaceae* (۲۰)، AG-6 و AG-7 اصولاً بیماریزای گیاهی نیستند و عمدتاً از خاک جداسازی شده‌اند (۲٤). AG-8 بیماریزای غلات (۱۹) و باقلای مصری(۲۷) است. AG-9 قدرت بیماریزایی کمی درخانواده‌های *Brassicaceae* و *Solanaceae* از جمله سیب‌زمینی دارد(۷)، و جدایه‌های غیربیماریزای AG-10 از گیاه جو جدا شده است(۲٤).

گونه *R. solani* اولین بار در ایران از گیاهان سیب‌زمینی و کاج ایرانی (*Pinus eldarica*. Medw) توسط شریف و ارشاد (۳) و از گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) توسط منوچهری و قنادزاده (٤) گزارش شده است. پس از آن نیز مطالعات بیماری‌شناسی زیادی روی گونه‌های مختلف این جنس منتشر گردیده (۱،۲) که در بیش از ۹۰ درصد موارد گونه شناسایی شده *R. solani* می باشد. تاکنون، مطالعات چشمگیری روی گیاه چمن(*Lolium perenne* L.) و به تبع آن بیماریهایش، خصوصاً در ایران انجام نشده است. شاید یکی از مهمترین دلایل، غیرزراعی بودن این گیاه است. بخش عمده‌ای از زیبایی فضای سبز بوجود چمنی سر سبز و شاداب وابسته است. یکی از مهمترین بیماریهای قارچی ایجاد شده روی چمن، بیماری لکه قهوه‌ای (Brown Patch) می باشد. بروز عامل بیماری براساس مشخصات مورفولوژیکی ریسه *R. solani*، چند هسته‌ای بودن سلولهای آن و درجه حرارت بهینه رشد تشخیص داده شده است(۱۰).محققین روشهای مختلفی را جهت شناسایی و تعیین خصوصیات این قارچ بکار برده اند که متداولترین آنها، استفاده از پدیده فیزیولوژیک آناستوموز است. براین اساس تاکنون ۱٤ گروه آناستوموزی در سرده (جنس) *Rhizoctonia* و ۵ گروه آناستوموزی نیز بعنوان زیر گروه جدا شده است، که بر اساس صفات مورفولوژیکی، بیماریزایی و مولکولی متمایز می شوند(۲۲). یکی از این گروهها، گروه آناستوموز دو یا AG-2 است که انتشار جهانی دارد و بر پایه خواص بیماریزایی و نیاز به تیامین به دو زیر گروه AG 2-1 و AG 2-2 تقسیم می گردد (۲۵). تعیین گروه آناستوموزی مستلزم صرف وقت و در برخی موارد نیز فاقد دقت کافی است و بنابراین تعیین تنوع ژنتیکی امکان پذیر نمی‌باشد. در نتیجه روشهای مولکولی متنوعی برای گروه بندی جدایه‌های *R. solani* بکار می رود که از جمله می توان DNA/DNA hybridization، آنالیز DNA ریبوزومی(rDNA)، و RAPD-PCR را نام برد. این روشها همولوژی کمی را بین گروههای آناستوموزی مختلف نشان می دهند (۱۳).

از بین روشهای متداول، الکتروفورز ایزوآنزیمها خصوصاً پکتیک زایموگرم در تشخیص جدایه قارچها و تعیین تنوع ژنتیکی و فیزیولوژیکی بین افراد مختلف آنها از جمله *R solani*، کاربرد وسیعی پیدا کرده است (۲۲،۱٦،۱۵). هر چند بیماریزایی این قارچ از اهداف مطالعه حاضر نیست ولی استفاده از زایموگرم در جهت شناخت تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای این قارچ، می تواند ما را در مطالعه اپیدمیولوژی آن جهت برنامه ریزی برای مبارزه با این عامل بیماریزا یاری کند.

مواد و روشها

الف- جمع آوری نمونه: نمونه‌گیری از چمن کاری مناطق مختلف پارکها و فضای سبز اصفهان و از لکه‌هایی که ظاهراً علائم بیماری رایزوکتونیایی را نشان میدادند در فصل بهار و تابستان انجام شد. نمونه برداری جمعاً از ۲۳ محل صورت گرفت که یازده نقطه از پردیس دانشگاه اصفهان و دوازده نقطه دیگر از سطح شهر اصفهان (شرق، غرب، شمال، جنوب و مرکز) انتخاب گردید. رقم چمن کشت شده از نوع Sport چهار تخم هلندی می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

بوته‌های به ظاهر آلوده از محل لکه‌های زرد شده چمن با ریشه جمع‌آوری و پس از انتقال نمونه به آزمایشگاه ریشه ها از بوته جدا، بمدت دو ساعت با آب جاری و ۱۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد همراه با چند قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شد. سپس سه بار با آب مقـطر سترون شستشو و آب اضافی با کاغذ صافی گرفته شد. در هر پلیت نیمه پر PDA ۰/۱ تعداد ۵ قطعه ریشه نمونه قرار داده شد سپس نمونه ها در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند. پلیتهای کشت شده هر ٢٤ ساعت یکبار بازدید می شدند و کلنی قارچهای رشد کرده اطراف هر نمونه با میکروسکوپ بررسی و کلنیهای شبیه *Rhizoctonia* ، که با روش کشت نوک ریسه در محیط Potato Dextrose Agar PDA دارای 1ml/L اسیدلاکتیک منتقل و در انکوباتور نگهداری شد. جدایه‌های خالص جهت نگهداری طولانی‌تر به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر PDA منتقل و درب لوله‌ها با پنبه و پارافیلم بسته شد(جدایه‌ها در این روش هر سه ماه یکبار تجدید کشت شدند). جهت نگهداری طولانی‌تر، جدایه‌ها به لوله‌های آزمایش دارای خاک الک شده (یک قسمت رس، یک قسمت ماسه و یک قسمت سبوس برنج) مرطوب و کاملاً سترون منتقل گردید(٦).

ب- بررسیهای مورفولوژی: برای اطمینان از وجود قارچ *R. solani*، ویژگیهای ماکروسکوپی، تولید سختینه، وجود ریسه‌های قطور با دیواره عرضی مشخص، انشعابات ۹۰° قـارچ، و وجود فرورفتگی در محل انشعـــاب با استفاده از میکروسکوپ بررسی گردید(۸).

ج- شمارش هسته‌ها: برای رنگ‌آمیزی هسته از روش Bandoni (۵) استفاده شد. باین نحو که ریسه‌های جوان روی لام با یک قـطره محلـول ســـافرانین (Safranin-O) رنگ‌آمیزی و پس از لامل‌گذاری توسط میکروسکوپ بررسی شدند. در این روش رنگ‌آمیزی، هستکها رنگ بیشتری بخود می‌گیرند و بقیه قسمتهای هسته بصورت یک هاله شفاف در اطراف هستک دیده می‌شوند. در این روش رنگ هسته ها قرمز است.

د- شناسایی گروه آناستوموزی: جدایه استاندارد AG-2 IV (نمونه استاندارد توسط آقای دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی از دانشگاه شیراز در اختیار قرار گرفت) با جدایه های بدست آمده از چمن تلاقی داده شد. بدین ترتیب که جدایه‌ها با فاصله ۲ سانتیمتر روی لام حاوی آب آگار قرار گرفتند و پس از رشد در شرایط مطلوب و تلاقی ریسه ها، لامل‌گذاری و بررسی شدند.(۲۱) برای اطمینان از وقوع آناستوموز، الحاق دیواره سلولی و ارتباط پروتوپلاسمی حداقل در ۵ نقطه مشاهده گردید(۲۰).

ه- تولید آنزیم: دیسکی به قطر ۵ میلی متر از جدایه‌های خا لص سازی شده قارچ *Rhizoctonia* در محیط PDA به شیشه‌های ۱۰ میلی لیتری درب دار استوانه ای (Bijoux bottle)، حاوی ۲ میلی لیتر محیط کشت مایع القاءکننده ترشح آنزیم پکتینازمنتقل گردید. این محیط حاوی یـک درصد سیتروس پکتین بعنوان تنها منبع کربن برای تغذیهٔ قارچ است مدت کشت ده روز، در تاریکی و دمای ۲۵ درجه می باشد (۲۷). صد میکرولیتر از محیط مایع، محتوی پکتیناز، با ۰/۰۱ گرم سفادکس (G-150) مخلوط و جهت انجام الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت.

و-تهیه ژل: الکتروفورز با روش Wade و Cruickshank (۱۰) و تهیه ژل پکتین اکریل آمیداز بروش Sweetingham و همکاران (۲٦) انجام شد. پس از تهیه ژل به هر یک از چاهکها ۱۰ میکرولیتر محیط مایع (پکتیناز دار) مخلوط با سفادکس اضافه شد. در چاهک ابتدایی و انتهایی بروموفنل بلو ۵ درصد بعنوان رنگدانه نشانه ریخته شد. ارتباط بین قطبهای مثبت و منفی الکتروفورز با پارچه کتانی برقرار گردید. شدت جریان ١٦ میلی‌آمپر و ولتاژ شروع ۳۸-۳٤ ولت بود. دمای ثابت ۵-٦ درجه سانتی گراد با عبور آب سرد از زیر صفحه نگهدارنده ژل جهت جلوگیری از تقلیب آنزیمی در اثر عبور جریان الکتریسیته وایجاد گرما

Archive of SID
www.SID.ir

برقرار شد. پس از حرکت نشانگر برموفنل بلو به مسافت ۵ سانتیمتر جریان الکتریسیته قطع و قبل از رنگ آمیزی، ژل بمدت ۱/۵ ساعت در محلول مالیک اسید DL ۰/۱ مولار و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار گرفت. پس از دو بار شستشو با آب مقطر ژل بمدت ۱۸ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی روتینیوم قرمز در یخچال و دمای ۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ژل پس ازچندین بار شستشو ۲۰ دقیقه در محلول ۰/۰۵ درصد آمونیوم پرسولفات برای افزایش وضوح قرار گرفت (۲٤). ژل را با آب مقطر شسته، و با استفاده از کاغذ عکاسی با حساسیت بالا و روش عکاسی مستقیم از آن عکس گرفته شد. روی کاغذ عکاسی الگوهای آنزیمی و میزان R*f* (نسبت فاصله طی شده توسط آنزیم به فاصله طی شده توسط برموفنل بلو در زمان الکتروفورز) ایزوآنزیمها مورد مطالعه قرار گرفت. باندهای ظاهر شده روی کاغذ عکاسی به دورنگ سیاه و سفید ظاهر شدند. باندهای سیاه نشانگر حضور ایزوآنزیم پلی گالاکتوروناز (PG) و باندهای سفید نشانگر حضور ایزوآنزیم پکتین استراز (PE) منظور شد (۱۰). نمونه های شناسایی شده بعنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت و الکتروفورز هر ژل سه بار تکرار گردید.

ز- آنالیز داده ها: تشابه ژنتیکی بین الگوهای زایموگرام از طریق مقایسه دوگانه بین جدایه های مورد آزمایش صورت گرفت و جدول تشابه ژنتیکی تعین گردید (۲۳).

نتایج

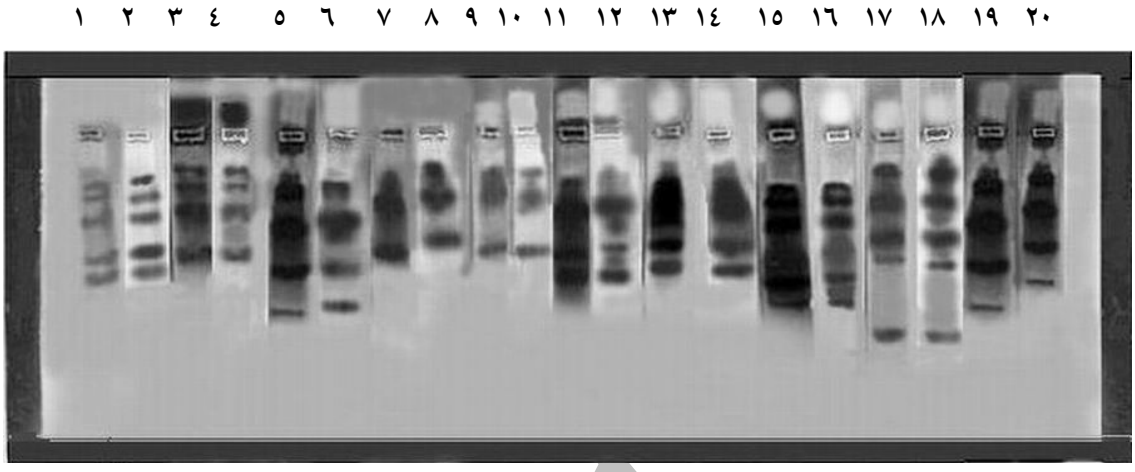
تعداد هسته‌های رنگ آمیزی شده بوسیله محلول رنگی سافرانین و بزرگ‌نمایی ٤۰ عدسی شیئی میکروسکوپ شمارش شد. در همهٔ جدایه‌های مورد مطالعه تعداد هسته‌ها بیش از دو عدد بود. جهت تعیین نوع گروه آناستوموزی برخورد و تلاقی ریسه های جدایه با جدایه استاندارد، استفاده از میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ٤۰ انجام، بررسی و مشاهده شد که در برخی موارد پس از الحاق و اتصال بین ریسه های دو جدایه هر دو زنده می مانند، و در بعضی نیز اتصال ریسه ها سبب مرگ سلولهای الحاق یافته و چند سلول در نزدیکی محل الحاق می شود.

الگوهای ایزوزایمی ۲۵٦ جدایه حاصل از ریشه ها تعین گردید.. این الگوها دارای باند آنزیمهای پلی گالاکتوروناز (PG) و پکتین استراز (PE) است. برای بدست آوردن بهترین الگوی آنزیمی، بهترین زمان برای برداشت آنزیم از محیط مایع القاءکننده ۹ روز در حجمی معادل ۲ میلی لیتر محیط مایع تعیین شد. الگوهای بدست آمده براساس تنوع در ١٤ گروه زایموگرمی (ZP) قرار گرفتند. پس از انجام آناستوموز بین جدایه هایی از هر گروه زایموگرمی چهار گروه متعلق به AG-2 نبوده و ۱۰ گروه زایموگرمها متعلق به آن است (شکل ۱). ایزوزایمهای پلی گالاکتوروناز (PG) در همهٔ جدایه‌ها و ایزوآنزیم پکتین استراز (PE) در بسیاری از آنها مشاهده گردید. در جدایه‌های آزمایش شده ۱۰ الگوی زایموگرمی (Zymogram Pattern) ZP1 تا ZP10 نامگذاری شد. در این تعداد الگو جمعاً ۱۱ باند از a تا k (بر اساس ضریب R*f*) شناسایی گردید. فقط باند a و a' متعلق به پکتین استراز است که مقدار *Rf* آنها در همهٔ گروهها یکسان می باشد و ۱۰ باند دیگر متعلق به ایزوآنزیم PG با R*f* های متفاوت است. فراوانی باندها از ۳ تا ٦ متغیر می باشد. ۵ باند i، h، f، e و c بیشترین فراوانی را در گروههای مختلف زایموگرامی دارند. در بیشتر گروهها حداقل ۳ باند پلی گالاکتوروناز مشاهده می شود (شکل۲).

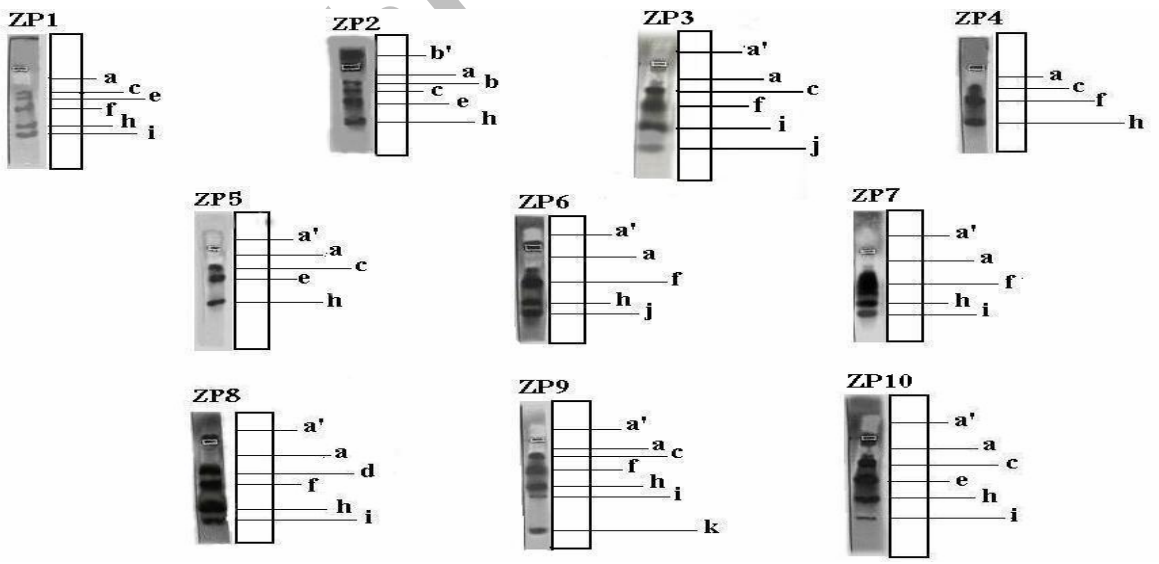
براساس نتایج بدست آمده، فراوان‌ترین الگوی آنزیمی، ZP10 با فراوانی ۵۵ است و ZP1 و ZP6 از کمترین فراوانی برخوردارند. در مطالعه الکتروفورزی آنزیم پکتیناز دو جایگاه ژنی، یکی برای آنزیم پکتین‌استراز (یک‌شکلی) و دیگری برای پلی‌گالاکتوروناز(چندشکلی) شناسایی گردید. با مقایسه فراوانی باندها در گروههای آنزیمی امکان محاسبه درصد تشابه ژنتیکی الگوهای مختلف

Archive of SID
www.SID.ir

زایموگرمی، بر اساس حضور کل باندها فراهم شد (جدول۱ و جدول۲). بیشترین تشابه میان گروه ZP1 با گروههای ZP9 و ZP10 مشاهده می شود. ZP5 بدلیل شباهت کمتر با بقیه گروهها از نظر ژنتیکی متفاوت است (جدول ۲).



شکل۱. پکتیک زایموگرافی جدایه های *R. solani* گروه AG-2 جدا شده از چمن کاریهای سطح شهر اصفهان (هر جدایه در دو تکرار). خط ۱و۲: جدایه A1، الگو ZP1؛ خط ۳و٤: جدایه F3، الگو ZP2؛ خط ٥و٦، جدایه G5، الگو ZP3؛ خط ۷و۸: جدایه T3، الگو ZP4؛ خط ۹و۱۰: جدایه R39، الگو ZP5؛ خط ۱۱و۱۲: جدایه R23، الگو ZP6؛ خط ۱۳و۱٤: جدایه V1، الگو ZP7؛ خط ۱٥ و ۱٦: جدایه B8، الگو ZP8؛ خط ۱۷و۱۸: جدایه R9، الگو ZP10؛ خط ۱۹و۲۰: جدایه R29، الگو ZP9.



شکل۲: الگوهای زایموگرام (Zymogram Pattern) جدایه های گروه AG-2 قارچ *R. solani*. الگوهای ZP1-ZP10 بر اساس تعداد کل باندهای مربوط به پلی گالاکتورناز و پکتین استراز. باندهای a و a' مربوط به پکتین استراز و باند های b,c,d,e,f,g,h,i,j,k, و l مربوط به پلی گالاکتورناز است.

www.SID.ir

جدول ۱. فراوانی باندهای پلی گالاکتوروناز و پکتین استراز بین ۱۰ گروه زایموگرام جدایه های AG-2 قارچ *R. solani*

الگو	باند											
	a	b	c	d	e	f	h	i	j	k	a'	b'
ZP1	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰
ZP2	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱
ZP3	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۰
ZP4	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰
ZP5	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۰
ZP6	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۰
ZP7	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰
ZP8	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰
ZP9	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۰
ZP10	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۱	۰

جدول ۲. تشابه ژنتیکی بین گروههای مختلف زایموگرام حاصل از جدایه های AG-2 قارچ *R. solani*

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4	ZP5	ZP6	ZP7	ZP8	ZP9	ZP10
ZP1	100									
ZP2	72.2	100								
ZP3	72.7	40	100							
ZP4	80	66.6	66.6	100						
ZP5	80	88.8	44.4	75	100					
ZP6	60	44.4	66.6	75	50	100				
ZP7	80	44.4	66.6	75	50	75	100			
ZP8	72.2	40	60	66.6	44.4	60	88.8	100		
ZP9	90.9	54.4	80	80	60	72.2	80	72.2	100	
ZP10	90.9	80	66.6	66.6	80	44.4	66.6	60	72.2	100

بحث

تعداد هسته در سلولهای رویشی قارچ *Rhizoctonia* یکی از معیارهای شناسایی گونه محسوب می‌شود. در سلولهای جوان تعداد هسته بین ۳ تا ۲۸ عدد و در سلولهای مسن کمتر می‌باشد(۲٤). بـا توجه به نتایج آزمایشات انجـام شده و بررسیهـای آناستوموزی، مشخص می شود از ۲٥٦ جدایه حاصل از چمن اصفهان تعداد ۲٥۲ جدایه متعلق به گروه آناستـوموزی دو(AG-2) و تعداد ٤ جدایه از نوع دو هسته ای می باشند. عموماً جهت شناسایی زیر واحدهای

Archive of SID
www.SID.ir

جمعیتی قارچها، خصوصیات مورفولوژیکی محدودی وجود دارد. بنابراین استفاده از روشهای شیمیایی و مولکولی برای این امر ضرورت دارد (۱۱). یکی از این شیوه‌های مفید مقایسه الگوهای الکتروفورزی پروتئینها، بویژه ایزوزایمهای آنزیمهای ویژه‌ای مانند آنزیم پکتیناز مورد استفاده در این مطالعه است. پکتیک زایموگرم نشانگری مناسب برای مطالعه تنوع ژنتیکی و اپیدمیولوژی قارچ *Rhizoctonia* ، شناخته شده (۱۲) و الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل‌آمید افقی پکتین Cruhckshank & Wade (۱۰) بعنوان روشی مناسب برای تفکیک انواع آنزیمهای پکتیکی معرفی شده اند. غالباً گروههای زایموگرمی به گروههای آناستوموزی تعیین شده مرتبط می‌شوند(۱۸). آنالیزهای زایموگرمی در شناسایی گروههای درون گونه‌ای نژاد AG-8 ، عامل بیماری Bare patch گندم در استرالیا، بکار رفته است. گروه زایموگرم ایزوله‌های یک لکه (Patch)، مشابه است. ولی لکه‌های مختلف، توسط گروه‌های زایموگرم متفاوت ایجاد می شدند (۱۳،۱۲) که با نتایج این مطالعه مشابه است. ایزوله‌های این مسئله بیانگر اینست که ظاهراً گروههای آناستوموز قادر به رشد در قلمرو یکدیگر نیستند. بنابراین اگر در لکه‌ای به واسطه جهش گروه‌های زایموگرمی متفاوتی ایجاد شود، این لکه در طی زمان براساس گروه زایموگرمی تفکیک شده و کوچک و محدود می‌شوند. جدایه‌های بدست آمده از لکه‌های مختلف شکل و سرعت رشد متفاوتی دارند.

Cruickshank (۹) بیان کرد که چندین گروه زایموگرمی(ZGs) در گروه آناستوموزی AG-2 وجود دارد. طبق تحقیقات انجام شده توسط MacNish و همکارانش (۱۶) برای گروه آناستوموزی AG 2-1 دو الگوی زایموگرمی ZG5 و ZG6 وجود دارد که هر دو میزبانهای مختلف دارند. ZG5 بیماریزای خانواده شب‌بو (Brassicaceae) و ZG6 بیماریزای خانواده نخود (Fabaceae) است. بر اساس یافته‌های آنزیمی در این تحقیق، با استفاده از الکتروفورز پکتیک زایموگرم، ۱۰ الگوی زایموگرمی (ZP1-ZP10) شناسایی شد که تعیین گروه زایموگرامهای متداول در این گروه آناستوموز مستلزم جمع آوری نمونه از سایر قسمتهای کشور می باشد تا بتوان در تعیین و معرفی گروه زایموگرم با دقت بیشتری اقدام نمود. تنوع در فعالیت آنزیم پکتیناز در گروه AG-2 رایزوکتونیا که در این تحقیق برای اولین بار روی چمن گزارش می‌شود، ممکن است به آللهای مختلف یا لوکوسهای ژنی مختلف وابسته باشد که محصولات آنها توان حرکتی مختلفی در ژل الکتروفورز دارند. تنوع در آنزیمهای پکتیناز جدایه‌های AG-2 که در این بررسی گزارش می شود، با گزارش هتروژن بودن این گروه آناستوموزی که بر اساس آنالیزهای RFLP توسط Matsumoto و همکارانش(۱۷) انجام شده تطابق دارد.

Yangدر ۱۹۹۳ (۲۹) پیشنهاد نمود که بیان آنزیمهای پکتیناز در جدایه‌های مزرعه‌ای *R. solani* توسط لوکوسهای ژنی چندگانه انجام می شود و احتمال پیوستگی در میان این لوکوسها در ZG 1-1 از گروه آناستوموز AG-8 وجود دارد. حضور باندهای پلی گالاکتوروناز مختلف در تحقیق انجام شده پیشنهاد می‌کند که بیان آللها در لوکوسهای مختلف، کنترل می‌شود. حضور باندهایی چون a نشان می‌دهد که این لوکوس در نژاد AG-2، قارچ *R. solani* حفظ شده است. لوکوسهای ژنی چندگانه می‌توانند چندین الگوی زایموگرم را در میان جدایه‌های یک گروه آناستوموزی ایجاد کنند. بنابراین یک الگوی مشترک در باندهای ثابت بعنوان الگوی زایموگرمی مشخص، برای ارتباط نزدیک جدایه‌ها در نظر گرفته می‌شود و از اختلافات کوچک در باندهای ضعیف صرفنظر می‌گردد. چون در تکنیک زایموگرم، تولید آنزیمهای پکتیناز القایی است، این امکان وجوددارد که شرایط تغذیه‌ای، محیط کشت یا حالت فیزیکی قارچ روی وضوح باندها، مقدار R*f* و قابل تکرار بودن باندها اثر بگذارد. وارد کردن مقادیر نامساوی آنزیمها در چاهکهای ژل نیز می‌تواند روی وضوح و اندازه R*f* و ایجاد باندها اثر بگذارد. ژنوتیپ

Archive of SID
www.SID.ir

جدایه های *R. solani* ممکن است به سبب تشکیل هتروکاریون، آناستوموز و جهش تغییر یابد. این تغییرات روی لوکوسهای کدکنندهٔ آنزیم پکتیناز اثر کرده و الگوهای زایموگرم جدیدی را ایجاد می‌نمایند. بنابراین اگر تکنیک زایموگرم برای شناسایی نژادهای *R. solani* مورد استفاده قرار گیرد، باید ارتباط تنوع ژنتیکی و گروه زایموگرم دارای ثبات کافی باشد. انجام تمام مراحل آزمایش در شرایط کاملاً یکسان برای کل جدایه‌ها و استفاده از اطلاعات دارای عمومیت بیشتر و قابل تکرار بودن آنها، می‌تواند در دسترسی به این ثبات کمک زیادی نماید(۲۸). جهت اطمینان از نتایج حاصله، در این تحقیق هر جدایه دو تا سه بار الکتروفورز گردید و پایداری الگوهای زایموگرام مورد بررسی دقیق قرار گرفت (١٤) و شباهت و یا عدم شباهت الگوها تعیین شد. بنظر می‌رسد استفاده از قالب ژل یکسان با ضخامت ۱/۵ میلی‌متر برای تمام جدایه‌ها، نتایج دقیق‌تر و مشابه‌تری می‌دهد. با استفاده از این قالب، تفکیک باندی الگوها واضح‌تر است. ضخامت زیاد ژل می‌تواند مانعی برای رانش آنزیم باشد. از پارامترهای الکتروفورز بهتر جدایه ها استفاده از محلول تانک بافر، تازه تهیه شده و ژل بدون حباب هوا است. در این مطالعه مقدار آنزیم پکتیناز (۱۰ میکرولیتر) هنگام نمونه‌گذاری نیز می‌تواند در وضوح R*f* مؤثر باشد. سن ریسه‌های کشت شده در محیط مایع ۹ روز می با شد.

وجود میزبان اختصاصی برای هر گروه آناستوموزی می‌تواند بوسیله انشعاب هر گروه آناستوموزی از یک ذخیره ژنی مشترک توصیف شود. بنابراین ممکن است تمایز ژنتیکی در هر گروه آناستوموزی بتدریج باشد و زیرگروههای زایموگرمی مختلف را ایجاد کند. جدول(۲) نشان می دهد که گروه ZP1 با گروه ZP9 و ZP10 بیشترین تشابه را دارد. احتمالاً این جمعیتها از یک ذخیره ژنی مشترک منشاء گرفته‌اند که به مرور زمان تشکیل هتروکاریونها، آناستوموز و موتاسیون توانسته‌اند لوکوسهای کد کننده آنزیمهای پکتیناز را تحت تأثیر قرار دهند و الگوهای آنزیمی جدیدی ایجاد نمایند. براساس نتایج بدست آمده از الکتروفورز ایزوآنزیمهای پکتیناز، الگوی آنزیمی ZP10 با فراوانی ۵۵، فراوان ترین الگوی آنزیمی بوده و دارای وسعت پراکنش زیاد و بیشترین سازگاری با شرایط اکولوژیکی، آب و هوایی و خاک اصفهان را دارد. ZP1 و ZP6 از کمترین فراوانی برخوردارند. آنالیزهای زایموگرمی ثابت می کند که تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ۲۵۲ جدایه AG-2، آزمون شده وجود داشته و ممکن است به آللهای مختلف یا لوکوسهای ژنی مختلف بستگی داشته باشند، که در نتیجه باعث توان حرکتی مختلف آنزیمها در ژل الکتروفورز می‌گردد. با توجه به نتایج حاصل بنظر می رسد این روش علاوه بر تعین تنوع درون گروهی، نشانگر مناسبی جهت مطالعه پراکنش جمعیت قارچ در یک منطقه است. لذا با توجه به اینکه جهت تعیین روش مبارزه مناسب، مطالعه اپیدمیولوژی قارچ بایستی انجام شود بنظر می رسد اطلاعات زایموگرامی، بخصوص نداشتن تنوع زایموگرامی در هر لکه بیمار، و در نتیجه فراوانی و گسترش زایموگرامها می تواند بعنوان شاخص مطالعه اپیدمیولوژی اطلاعات کافی در سیاست گذاری مبارزه علیه قارچ فراهم نماید.

منابع

۱- اشکان، م.، ابوسعیدی، د. و حمدا... زاده، ا. ١٣٧٤. بوته میری زودرس و دیررس پسته توسط *Rhizoctonia solani*. دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۲۱۹.

۲- حمدا... زاده، ا. و رحیمیان، ح. ١٣٦٨. آناستوموز گروه ٤ به‌عنوان مهمترین عامل بیماری رایزوکتونیایی کتان و سویا در گرگان. نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. مشهد، ۱۱۰.

Archive of SID
www.SID.ir

۳- شریف، ج. و ارشاد، د. ۱۳٤٥. لیستی از قارچهای موجود روی گیاهان زراعی، درختچه‌ها و درختان ایران. وزارت کشاورزی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، اوین، تهران.

٤- منوچهری، ا. و قنادزاده، ح. ۱۳۷٥. پوسیدگی غلاف لوبیا در کرج. مجله بیماریهای گیاهی ایران ۳، ۹-۱.

5-Bandoni, R. J. 1979. Safranin as a rapid nuclear strain for fungi. *Mycologia* 71, 873-874.

6-Butler, E. E. (1980). A method for long-time culture storage of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70, 820-821.

7-Carling, D. E., Leiner, R. H. and Kebler, K. M. (1987). Characterisation of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 77, 1609-161.

8-Carling, D. E. and Summer, D. R. 1992. *Rhizoctonia*. In: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi (eds. Singleton, L. C., Mihail, J. D., and Rush, C. M.). APS Press. USA. 157-165.

9-Cruickshank, R. H. 1990. Pectic zymograms as ceiteria in taxonomy of Rhizoctonia. *Mycological Research* 94, 938-946.

10-Cruickshank, R. H. and Wade, G. C. 1980. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamid gel. *Annual Biochemistry* 107, 177-181.

.11-Jabaji-Hare, S. H. 1996. Biochemical methods. In: B. sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Editors), *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands, 65-71.

12-Lecours, N., Luigi, T., Sieber, T. N. and Petrini, O. 1994. Pectin enzyme patterns as a taxonomic tool for the characterisation of Gremmeniella sp. Isolates. *Canadian Journal of Botany* 72, 891-896.

13-Lubeck, M. and Poulsen, H. 2001. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. *Microbiology Letters* 201, 83-89.

14-MacNish, G. C. and Sweetingham, M. W. 1993. Evidence of stability of pectic zymogram groups within *Rhizoctonia solani* AG-8. *Mycological Research* 97, 1056-1058.

15-MacNish, G. C. and Sweetingham, M. W. 1993. Evidence of stability of pectic zymogram groups within *Rhizoctonia solani* AG-8. *Mycological Research* 97, 1056-1058.

16-MacNish, G. C., Carling, D. E., Sweetingham, M. W. and Brainard, K. A. 1994. Anastomosis group(AG) affinity of pectic isozyme (zymogram) groups(ZGs) of *Rhizoctonia solani* from Western Australia cereal-belt. *Mycological Research* 98, 1369-1375.

17-Matsumoto, M., Furuya , N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. 1996. RFLP analysis of the PCR-amplified 28S rDNA in *Rhizoctonia solani*. *Mycoscience* 37, 351-359.

18-Neate, S. M., Cruickshank, R. H. and Rovira, A. D. 1988. Pectic enzyme patterns of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in South Australia. *Transaction of the British Mycological Society* 85, 37-42.

19-Neate S. M. and Warcup, J. H. 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 85,615-620.

20-Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology* 25, 125-143.

21-Parmeter Jr, J. R., Sherwood, R. T. and Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59, 1270-1278.

22-Rosewich, U. L., Pettway, R. E., Medonald, B. A. and Kistler, H. C. 1999. Hight levels of gene flow and heterozygote excess characterise *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics and Biolbgy* 28, 148-159.

23-Sneath, P. & Sokal, R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practise of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco, USA.

24-Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN USA, 133.

25-Stevens Johnk, J. and Jonse, R. K. 1993. Differentiation of populations of AG 2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. *Phytopathology* 83, 278-283.

26-Sweetingham, M. W., Cruick, R. H. and Wong, D. H. 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of *Ceratobasidiaceae*. *Transactions of the British Mycological Society* 86, 305-311.

Archive of SID
www.SID.ir

27-Sweetingham, M. W. 1990. *Rhizoctonia* root and hypocotyl rots. *Western Australian Journal Agricalture* 31, 11-13.

28-Xue, L. charest, P. M. and Jabaji-Hare, S. H. 1998. Systemic induction of peroxidases 1-3 beta-glucanases, chitinases and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* 88, 359-365.

29-Yang, H. A. 1993. Genetics of strains of *Rhizoctonia solani* Kühn associated with bare-patch disease of cereals (Ph. D. thesis). University of Western Australia.

Study of Intraspecific variation of anastomosis group AG-2 of *Rhizoctonia solani* isolated from lawn (*Lolium perene* L.) using pectic zymorgan marker

Balali G. R. and Moharabi, Z.

Biology Dept., Isfahan University, I.R. of Iran

Abstract

The species of *Rhizoctonia solani* is one of the most diverse and complex species that morphologically is similar to Basidiomycetous imperfect fungi. Its broad range and the lack of diagnostic characters create difficulties in the study of taxonomy and population genetics of this fungus. In this study zymogram of pectinase was used as a molecular marker to determine genetic variation of *R. solani* AG-2 which is known as the cause of brown patch of lawn disease. In this regard 252 out of 256 isolates recovered from lawn were identified as *R. solani* AG-2, based on the number of nuclei per cell and anastomosis reaction. In pectic zymogram analysis of the isolates tested two loci, one for polygalacturonase and the second for pectinestrase were identified. Based on polymorphisims in these two loci, ten zymogram patterns were distinguished for 252 isolates tested. It seems not only this technique is a fast and reliable method to identify anastomosis groups of *R. solani* but also it could employed to study intraspecific variation of this fungus.

Key words: Pectic zymogram, AG-2, *Rhizoctonia solani*

Archive of SID

www.SID.ir