

زایموگرافی درون گروهی جدایه های گروه آناستوموزی AG1-IA قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در استان گلستان

Intraspecific zymography of AG1-IA isolates of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight in Golestan province

مژگان کوثری*، ام البنین باقری، غلامرضا بلالی و منصور صلاتی

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان،
موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی گرگان

پذیرش ۱۳۸۷/۵/۲۳

دریافت ۸۶/۲/۲

چکیده

Rhizoctonia solani یکی از قارچ های بیماریزا است که خسارت عمده ای به محصولات مختلف زراعی وارد می سازد. زیر گروه آناستوموزی AG1-IA این قارچ، برنج را مورد حمله قرار داده و باعث ایجاد بیماری سوختگی غلاف برنج می شود. این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری های قارچی در مناطق برنجکاری دنیا شناخته شده است. در این مطالعه پس از جداسازی، خالص سازی و تعیین گروه آناستوموزی، ۷۵ جدایه قارچ AG1-IA *R. solani*. بعنوان عامل بیماری مورد شناسایی قرار گرفت. جهت بررسی ژنتیکی و شناسایی هر چه دقیق تر جدایه های قارچ AG1-IA *R. solani*، نشانگر پکتیک زایموگرام مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه الکتروفورزی آنزیم پکتیناز دو جایگاه یکی برای آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG) و دیگری برای پکتین استراز (PE) شناسایی شد. حضور یا عدم حضور هر باند بوسیله محاسبه مقدار *Rf* مشخص گردید. پس از بررسی یافته ها، ۱۵ باند پلی گالاکتوروناز (PG) و ۳ باند پکتین استراز (PE) شناسایی شد. فراوانی باندها در الگو های زایموگرمی بدست آمده بین ۸

تا ۱۷ عدد نوسان داشت. در نهایت شش الگوی آنزیمی برای جدایه های مورد مطالعه بدست آمد. پس از تهیه ماتریکس تشابه، بر اساس فراوانی باندها، میزان تشابه ژنتیکی بین ۶۲٪ تا ۸۸٪ محاسبه شد. دندروگرام رسم شده دارای دو شاخه اصلی بود که در یک شاخه تنها ZP3 قرار گرفت و در گروه دیگر الگوهای آنزیمی ZP1، ZP2، ZP4، ZP5 و ZP6 قرار گرفتند. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که اگر چه گروه آناستوموزی عامل بیماری سوختگی غلاف، AG1-IA است اما جدایه های این گروه آناستوموزی خود دارای تنوع درون گروهی می باشد. این تنوع بصورت تولید الگوهای آنزیمی متفاوت مشاهده می شود. این تنوع در ایزوانزیم های پکتیناز می تواند پتانسیل های مختلفی به بیمارگر بدهد.

واژه های کلیدی: سوختگی غلاف برنج، پکتیک زایموگرام، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

برنج در بین غلات تنها گیاه زراعی است که در آب جوانه می زند. کشت برنج تحت چنین شرایطی زمینه مناسب را برای رشد قارچ های بیماریزا فراهم می سازد، بنابراین بیماری های قارچی یکی از عوامل کاهش عملکرد برنج بویژه در مناطق مرطوب می باشد. از جمله قارچ های بیماریزای برنج مجموعه ریزوکتونیایی بیماری غلاف برنج است که خود شامل *Rhizoctonia solani*، *Rhizoctonia oryzae-sativae* و *Rhizoctonia oryzae* بوده و عامل مهمی در کاهش محصول در مزارع برنج در آسیا و ایران است (Ou 1987). قارچ *Rhizoctonia solani* یک گونه هموزن نیست بلکه به عنوان گونه تجمعی (Collective species) در نظر گرفته می شود. بر اساس تلفیق ریشه ها (Anastomosis reaction)، جدایه های *Rhizoctonia solani* به ۱۴ گروه آناستوموزی (AG) تقسیم شده اند. یکی از این گروه ها، گروه آناستوموزی یک (*R. solani* AG-I) با دو زیر گروه می باشد. زیر گروه AG1-IA آن جزو جدایه های چند هسته ای هتروکاریوتیک این قارچ می باشد که برنج را مورد حمله قرار داده و باعث ایجاد بیماری سوختگی غلاف (sheath blight) برنج می شوند (Ogoshi et al. 1983). این بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیماری های قارچی در مناطق برنجکاری دنیا شناخته شده است. وجود بیماری سوختگی غلاف در ایران طی سال های گذشته گزارش گردیده است (Torabi & Binesh 1984). در سالهای اخیر بدنال گسترش استفاده از کودهای شیمیایی و کشت

ارقام پر محصول که پنجه های متراکم و پر پشت تری دارند بیماری سوختگی غلاف اهمیت ویژه ای یافته است. این بیماری خسارت چشمگیری در مزارع برنج نواحی شمال کشور ایجاد می کند (Foroutan & Rahimian 1991).

قارچ ها ممکن است از طریق زخم ها و یا منافذ طبیعی به داخل گیاه راه پیدا کنند. برای استقرار قارچ در داخل میزبان اولین و مهمترین عامل توان استفاده قارچ از مواد غذایی موجود است که تولید آنزیم های ویژه ای را می طلبد (Adams 1988). یکی از این آنزیم ها آنزیم پکتیناز می باشد که نقش مهمی در ایجاد آلودگی و بیماری زایی دارد (Ou 1987). از بین روش های متداول، تکنیک پکتیک زایموگرام، روش مناسبی را برای تشخیص جدایه های زیادی از جمعیت رایزوتکونیا پدید آورده است (Adams & Butler 1979; Aoyagi *et al.* 1998). الگو های الکتروفورزی پکتیناز می توانند به عنوان نشانگر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی و تفکیک نژادهای قارچ های بیماریزا از جمله *R. solani* مورد استفاده قرار گیرد. تعیین گروه های زایموگرم (Zymogram groups) تکنیک کارآمدی از گروه ایزوآنزیم ها است که بصورت کاملا اختصاصی آنزیم های گروه پکتیک را جهت شناسایی گروه های مختلف در بین جمعیت های رایزوتکونیا به کار می گیرد. این شیوه بر اساس آشکار سازی پکتینازهای مختلف مانند پلی گالاکتورونازها، پکتین استرازها و پکتین لیازاها در ژل اکریل آمید حاوی پکتین مرکبات و رنگ آمیزی با روتینیوم قرمز بنا گذاشته شده است (Cruickshank & Wade 1980). این تکنیک ساده و قابل اعتماد بوده و امکان ارزیابی تعداد زیادی جدایه را در یک زمان فراهم می آورد. این روش علاوه بر کاربرد تاکسونومیکی قادر است میزان بیماریزایی جدایه ها را بر اساس وجود یا عدم وجود پکتینازهای آنها بیان کند (Jabaji-Hare *et al.* 1990).

روش بررسی

جمع آوری نمونه ها، جداسازی و خالص سازی جدایه های قارچ

با توجه به علائم بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از قارچ *R. solani* AGI-IA، گیاهان بیمار طی دو سال متوالی از مزارع برنجکاری در استان گلستان جمع آوری شد. نمونه برداری از مراحل پنجه زنی و شروع غلاف بندی آغاز و تا زمان برداشت برنج ادامه یافت. در نمونه برداری ها اطلاعاتی مثل نام منطقه، بخش بیمار گیاه، تعداد گیاهان آلوده در هر ۲۵ متر مربع از

شالیزار، مرحله رشد گیاه برنج (سبز شدن، پنجه زدن، تشکیل غلاف، باروری، رسیدن)، رقم برنج، تناوب کشت با گیاه دیگر، موقعیت جغرافیایی محل نمونه برداری، میزان و نوع کود مصرفی نیز ثبت شد.

کشت نمونه ها

قطعاتی حدود یک سانتی متر از غلاف و برگ گیاه بیمار از حد فاصل بافت سالم و مریض جدا گردید. پس از ضد عفونی سطحی با الکل، قطعات روی محیط کشت آب آگار ۲ درصد حاوی یک میلی لیتر اسید لاکتیک در هر لیتر محیط، کشت داده شد. این کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای C ۲۸ قرار گرفتند. ریشه هایی که مشخصات قارچ ریزوکتونیا را نشان دادند با استفاده از روش کشت نوک ریشه به محیط کشت PDA (potato dextrose agar) انتقال داده شده و خالص سازی قارچ صورت گرفت. جدایه های قارچ به وسیله میکروسکوپ نوری نیز شناسایی شدند.

شناسایی جدایه ها

جهت شناسایی جدایه های قارچ بدست آمده از گیاهان بیمار، از روش های تعیین تعداد هسته و تعیین گروه آناستوموزی استفاده گردید. جهت تعیین دو یا چند هسته ای بودن جدایه ها از روش رنگ آمیزی باندونی (Bandoni 1979) استفاده شد و برای تعیین گروه آناستوموزی جدایه های بدست آمده، آزمون آناستوموز ریشه ها انجام شد (Parmeter et al. 1969). دو جدایه یکی استاندارد (AGI-IA, AGI-IB, AGI-IC, AGI-ID, AG-D, AGB-b) و دیگری مجهول بر روی لام حاوی آب آگار مقابل یکدیگر قرار داده شدند بعد از برخورد و تلاقی ریشه جدایه ها، لام ها در بزرگنمایی های ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروسکوپ مطالعه شد و گروه آناستوموزی آنها مشخص گردید. برای تعیین سرعت رشد جدایه ها، از حاشیه پرگنه کشت های دو روزه قارچ در محیط PDA یک بلوک به قطر ۵/۰ سانتی متر به وسط پتری ۹ سانتی متری از محیط کشت PDA منتقل و در دمای C ۲۸ نگهداری گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت میانگین رشد پرگنه در دو قطر عمود برهم اندازه گیری شد.

پکتیک زایموگرام

جهت شناسایی جمعیت بیمارگر *R. solani* عامل سوختگی غلاف و بررسی آلل های مشابه

و متفاوت آنزیم پکتیناز، فنوتیپ های پکتیک زایموگرام آنها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور انجام الکتروفورز نمونه ها، ابتدا محیط کشت القا کننده آنزیم های پکتیک (Pectic enzyme inducing medium) تهیه شد (Sweetingham *et al.* 1986). محیط کشت مایع تهیه شده حاوی یک درصد پکتین مرکبات، بعنوان تنها منبع کربن، بود (Sweetingham *et al.* 1986). از پتری های حاوی PDA که جدایه ها به مدت ۴ روز بر روی آن رشد کرده بود، قطعه‌ای به قطر ۵ میلی متر از حاشیه کلنی برداشته شد و به ۲ میلی لیتر محیط کشت القا کننده آنزیم پکتیک، در داخل شیشه‌های درب دار مخصوص (Bijoux bottle) اضافه شد (Sweetingham *et al.* 1986). شیشه های حاوی جدایه های قارچ به مدت ۱۰-۸ روز در دمای C ۲۸ بدون تکان و در تاریکی قرار داده شدند. پس از رشد، ریشه ها بر روی جدار شیشه قابل رویت بودند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محیط مایعی که آنزیم در آن القا شده بود برداشت و با آب مقطر سترون رقت های ۵۰ و ۲۵ درصد از آن تهیه شد. محلول های آماده شده در الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت. در هر یک از چاهک های ایجاد شده در ژل، ۱۰ میکرو لیتر از محیط مایع رقیق شده ریخته شد. از محلول رنگی برموفنل بلو به عنوان نمایانگر استفاده شد. ژل حاوی نمونه بر روی دستگاه الکتروفورز افقی که دمای آن در C ۵° ثابت شده بود قرار گرفت و جریان ۱۶ میلی آمپر از داخل آن برقرار گردید (Cruickshank & Wade 1980; Cruickshank 1983). ولتاژ شروع کار ۴۲ - ۳۰ ولت بود. زمانی که معرف رنگی به ۱ سانتی متری انتهای آند رسید دستگاه خاموش شد. کل مسافت طی شده ۵۶ میلی متر بود. بعد از اتمام الکتروفورز ژل به مدت ۹۰ دقیقه در داخل محلول انکوباسیون (Cruickshank 1990) در دمای C ۲۵-۲۲ قرار گرفت، طی این مدت pH ژل از ۸/۷ به ۳ کاهش یافت سپس ژل با آب مقطر شسته شد. برای آشکار شدن الگوهای آنزیمی ژل به وسیله محلول روتینیوم قرمز رنگ آمیزی گردید. ژل به مدت ۲۴ ساعت در محلول روتینیوم قرمز در دمای C ۴۰ در حالت تکان قرار گرفت. پس از پایان رنگ آمیزی، به منظور ایجاد وضوح بیشتر، ژل به مدت ۲۰ دقیقه داخل محلول ۰/۰۵٪ آمونیم پر سولفات قرار گرفت (Sweetingham *et al.* 1986). به منظور حفظ و تفسیر اطلاعات بدست آمده از ژل ها، عکس تهیه گردید. باندهای بدست آمده در الکتروفورز به عنوان لوکوس های کد کننده آنزیم های

پلی گالاکتوروناز (PG، مناطق سیاه در عکس) و پکتین استراز (PE مناطق سفید در عکس) و پکتین لیاز (PL مناطق زرد در عکس) تفسیر شد (Cruickshank 1983). حضور یا عدم حضور یک باند بوسیله محاسبه مقدار Rf که نسبت فاصله طی شده بوسیله یک آنزیم به مسافت طی شده بوسیله بروموفنل بلو است مشخص گردید.

نتیجه

جمع آوری نمونه، جداسازی و خالص سازی جدایه ها

پس از جداسازی عامل بیماری و خالص سازی آن ۷۵ جدایه قارچ *R. solani* AG1-IA مورد شناسایی قرار گرفت. علائم بیماری بصورت لکه های بیضی تا تخم مرغی شکل روی غلاف نزدیک سطح آب دیده می شد و در صورت توسعه بیماری، لکه ها در روی غلاف های بالاتر، پهنک برگ و همچنین در روی خوشه ها نیز مشاهده می گردید. طول لکه کامل معمولا ۲ تا ۳ سانتی متر، با مرکز خاکستری و حاشیه قهوه ای بود. یافته ها نشان داد که تعداد گیاهان آلوده در هر ۲۵ متر مربع از شالیزار در مزارع شهرستان های غربی استان گلستان یعنی بندر گز، کردکوی، گرگان، علی آباد، بندر ترکمن و آق قلا تقریبا ۶۵ عدد بوده و در نواحی شرقی استان، یعنی شهرستان های گنبد، مینو دشت و کلاله بطور متوسط ۴۴ گیاه بیمار در هر ۲۵ متر مربع از شالیزار مشاهده گردید.

شناسایی جدایه ها

ریسه های *R. solani* عامل بیماری در محیط کشت PDA ابتدا سفید رنگ بوده و سپس به رنگ قهوه ای روشن در آمدند. کشت ها فاقد منطقه بندی به صورت دوایر متحدالمرکز بود و سختینه (اسکلروت) های تشکیل شده روی محیط کشت شبیه سختینه هایی هستند که روی میزبان تشکیل می شوند ولی اندازه آنها کمی بزرگتر است (۳/۳-۱/۲×۱/۲-۴/۳-۱/۳). اسکلروت ها در محیط کشت بیشتر در کناره تشک و یا روی دیواره آن تشکیل می گردد و ممکن است ۲ تا ۳ سختینه به هم پیوسته باشند. این سختینه ها سفت نبوده و کمی حالت اسفنجی داشتند و در برش عرضی آنها لایه های مشخصی دیده نمی شد. ریسه های جوان این قارچ در محیط کشت که در لبه پرگنه ها قابل مشاهده هستند در زیر میکروسکوپ بیرنگ بوده و دیواره آنها نازک بود. از ریسه های جوان انشعاباتی با زاویه حدود ۹۰ درجه خارج می شود

که بعد از کمی رشد به موازات ریشه های اصلی به رشد ادامه می دهد. ریشه های مسن تر تغییر رنگ پیدا کرده و به رنگ قهوه ای روشن در آمدند. قطر ریشه از ۴/۴ تا ۱۲/۱ (میانگین ۷/۵) میکرومتر متغییر بود. دمای بهینه رشد قارچ ۲۸ درجه و دماهای کمینه و بیشینه به ترتیب ۱۰ و ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس تعیین گردید. در دمای بهینه، میانگین رشد روزانه قارچ ۳۱ میلی متر بود.

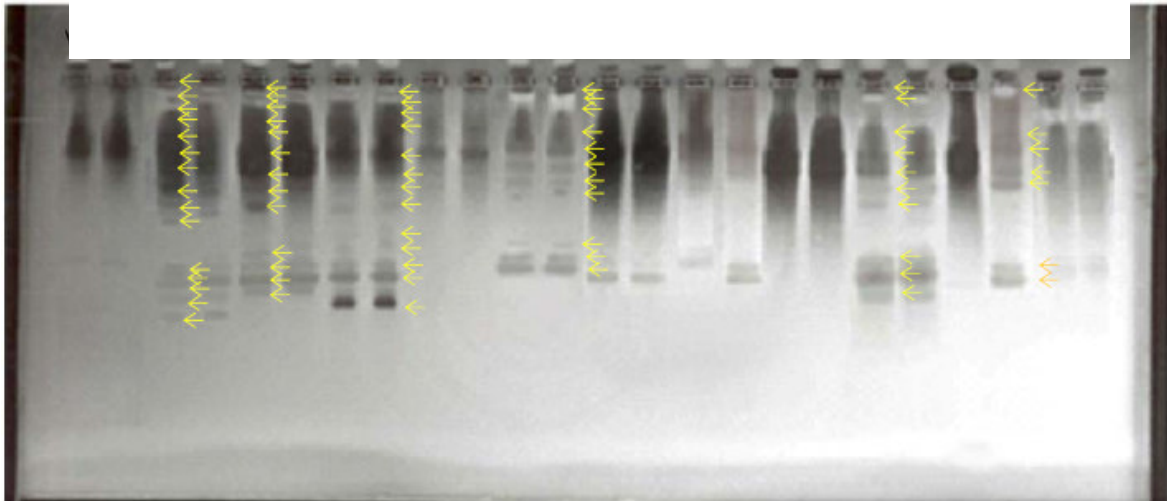
جدایه ها از نظر تعداد هسته به دو گروه چند هسته ای و دو هسته ای تقسیم شدند. تعداد هسته در سلول های چد هسته ای ریشه، ۳ تا ۱۸ عدد شمارش گردید سپس گروه آناستوموزی با استفاده از جدایه های استاندارد تعیین گردید. تعداد ۷۵ جدایه تحت گروه AGI-IA شناسایی گردیدند که این گروه عامل بیماری سوختگی غلاف برنج بود. تعداد ۱۴ جدایه با گروه استاندارد دو هسته ای AGB-b واکنش و ۱۰ جدایه با گروه آناستوموز دو هسته ای AG-D آناستوموز دادند.

آنالیز پکتیک زایموگرم

پس از خالص سازی ۷۵ جدایه متعلق به گروه آناستوموزی AGI-IA و انتقال آنها به محیط القای آنزیم، محلول حاوی آنزیم پکتیک بر روی ژل اکریل امید منتقل گردید که پس از الکتروفورز در نهایت الگوهای پکتیک زایموگرم درشش گروه (ZP1-ZP6) قرار گرفتند. شکل (۱) چند فرم از الگوهای الکتروفورزی متعلق به جدایه های متفاوت قابل مشاهده است. باندهای پلی گالاتوروناز (PG) و پکتین استراز (PE) در همه جدایه ها وجود داشت اما پکتین لیاز در هیچ یک از جدایه ها مشاهده نگردید. عدم یا حضور باندهای پلی گالاتوروناز (PG) و پکتین استراز (PE) برای همه الگوهای آنزیمی مشخص شد و مقدار Rf برای کلیه باندهای بدست آمده محاسبه گردید (جدول ۱). یافته ها نشان داد که برای بدست آوردن باندهای آنزیمی بطور کامل، بهترین زمان برای برداشت از محیط مایع القا کننده آنزیم، هنگامی است که ریشه ها ۹ روزه هستند.

بطور کلی در محاسبه مقادیر Rf ، ۱۸ باند (آلل)، شامل ۱۵ باند پلی گالاتوروناز (PG) و ۳ باند پکتین استراز (PE) شناسایی گردید. در این میان یک باند PG و یک باند کاندی، PE، در ناحیه بالای چاهک در همه الگوهای آنزیمی (ZP1-ZP6) مشاهده گردید. نتایج نشان داد که باند پلی گالاتوروناز با $Rf = 0.18$ دارای کمترین مقدار و یک باند پلی گالاتوروناز با

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



شکل ۱- اشکال مختلف از الگوهای الکتروفورزی در جدایه های *R. solani* AG1-IA از چپ به راست:

(۱) GLR57a (ZP3)، (۲) GLR57b (ZP3)، (۳) (GLR68) (ZP1)، (۴) (GLR30) (ZP1)، (۵) (GLR25) (ZP2)، (۶) (GLR73) (ZP2)، (۷) (GLR64) (ZP6)، (۸) (GLR13) (ZP6)، (۹) (GLR72)، (۱۰) (GLR72)، (۱۱) (GLR56) (ZP4)، (۱۲) (GLR63) (ZP4)، (۱۳) (GLR66) (ZP3)، (۱۴) (GLR66) (ZP3)، (۱۵) (GLR47) (ZP3)، (۱۶) (GLR54) (ZP3)، (۱۷) (GLR66)، (۱۸) (GLR66)، (۱۹) (GLR43) (ZP5)، (۲۰) (GLR42) (ZP5)، (۲۱) (GLR31) (ZP3)، (۲۲) (GLR51-2) (ZP3)، (۲۳) (GLR40) (ZP2)، (۲۴) (GLR19) (ZP2)

Fig. 1. The electrophoretic patterns of *R. solani* AG1-IA isolates(left to right)

- (1) GLR57a (ZP3), (2) GLR57b (ZP3), (3) (GLR68) (ZP1), (4) (GLR30) (ZP1), (5) (GLR25) (ZP2), (6) (GLR73) (ZP2), (7) (GLR64) (ZP6), (8) (GLR13) (ZP6), (9) GLR72, (10) GLR72, (11) (GLR56) (ZP4), (12) (GLR63) (ZP4), (13) (GLR66) (ZP3), (14) (GLR66) (ZP3), (15) (GLR47) (ZP3), (16) (GLR54) (ZP3), (17) (GLR66), (18) (GLR66), (19) (GLR43) (ZP5), (20) (GLR42) (ZP5), (21) (GLR31) (ZP3), (22) (GLR51-2) (ZP3), (23) (GLR40) (ZP2), (24) (GLR19) (ZP2).

جدول ۱- مقدار Rf محاسبه شده برای باندهای آندیک، ایزوانزیم پلی گالاکتوروناز (PG) و

پکتین استراز (PE) در هفت الگوی زایموگرمی جدایه های *R. solani* AG1-IA

Table 1. Rf values calculated for the polygalactronase (PG) and pectin esterase(PE) isozyme anodic bands for 7 zymogram groups of *R. solani* AG1-IA isolates

Rf values	Isozyme	Zymogram Patterns					
		ZP1	ZP2	ZP3	ZP4	ZP5	ZP6
0.018	PG	+	-	-	+	+	+
0.053	PE	+	+	+	+	+	+
0.089	PE	+	-	-	+	-	-
0.0107	PG	+	+	-	-	-	+
0.143	PG	+	+	+	+	-	+
0.214	PG	+	+	+	+	+	+
0.286	PG	+	+	+	+	+	+
0.321	PG	+	+	-	+	+	+
0.375	PG	+	+	-	+	+	-
0.411	PG	+	-	-	-	-	-
0.500	PG	-	-	-	-	-	-
0.536	PG	+	+	-	+	-	+
0.571	PG	+	+	+	+	+	+
0.625	PG	+	+	+	+	+	+
0.678	PG	+	+	-	+	+	+
0.732	PG	+	-	-	-	-	-

* یک باند PG و یک باند PE بصورت cathodic در همه الگوهای زایموگرمی وجود دارد که در جدول نشان داده نشده است.

$Rf = 0/732$ دارای بیشترین مقدار Rf است. محاسبه مقادیر Rf برای تمامی باندها در فوتیپهای زایموگرمی مشخص کرد که یک باند پکتین استر (PE) با مقدار Rf برابر با $0/053$ و ۴ باند پلی گالاکتوروناز (PG) با مقادیر Rf برابر $0/143$ ، $0/286$ ، $0/571$ و $0/678$ در همه الگوهای زایموگرمی بصورت مشترک وجود دارد (جدول ۱).

فراوانی باندها در الگوهای زایموگرمی بدست آمده بسیار متغییر بود بطوریکه با در نظر

گرفتن باندهای بالایی چاهک این تعداد بین ۸ در ZP3 تا ۱۷ در ZP1 نوسان داشت. الگوی زایموگرم ZP2 با ۱۵ باند، الگوی زایموگرمی ZP4 با ۱۳ باند، الگوی زایموگرمی ZP5 با ۱۱ باند، الگوی زایموگرمی ZP6 با ۱۵ باند و الگوی زایموگرمی ZP1 با ۱۷ باند تعیین گردیدند. الگوهای زایموگرمی بدست آمده در استان گلستان فراوانی متفاوتی نشان دادند بطوریکه در گروه زایموگرمی ZP3، ۲۳ جدایه، در گروه زایموگرمی ZP2، ۱۶ جدایه، در ZP1، ۱۴ جدایه، در ZP4، ۷ جدایه، در گروه زایموگرمی ZP5، ۵ جدایه و در گروه زایموگرمی ZP6، ۱۰ جدایه قرار گرفتند. الگوی زایموگرمی ZP3 با دارا بودن ۷/۳۰٪ جدایه ها دارای بیشترین فراوانی و الگوی زایموگرمی ZP5 با ۶/۷٪ جدایه ها دارای کمترین میزان فراوانی بود.

به منظور تعیین میزان تشابه بین فنوتیپ های الکتروفورزی، مقایسه چند فاکتوری بین همه آلل ها صورت گرفت. پس از تهیه ماتریکس تشابه، بر اساس فراوانی باندها (آلل ها)، میزان تشابه ژنتیکی بین دو مقدار ۶۲٪ تا ۸۸٪ مرتب گردید (جدول ۲).

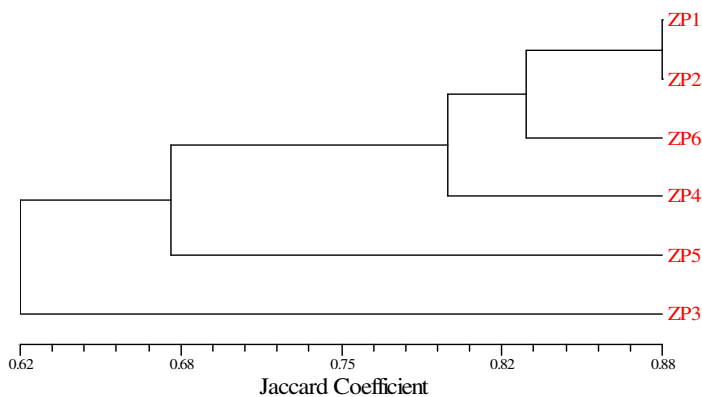
جدول ۲- میزان تشابه ژنتیکی بین فنوتیپ های آنزیمی (ZP)، بر اساس بررسی کلیه باندها

Table 2. Determination of genetic similarity among the electrophoretic phenotypes based on all of the bands

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4	ZP5	ZP6
ZP1	100	۱۰۰				
ZP2	88.2	100				
ZP3	52.9	60.0	100			
ZP4	76.4	86.6	69.2	100		
ZP5	64.7	73.3	66.6	71.4	100	
ZP6	77.7	87.5	60.0	75.0	62.5	100

برای نشان دادن تشابه بین فنوتیپ های آنزیمی، از نرم افزار NTSYS-pc 2.01 استفاده شد و با استفاده از روش UPGMA و ضریب جاکارد دندروگرامی ترسیم گردید (شکل ۲). دندروگرام دارای دو شاخه یا انشعاب اصلی بود که در یک شاخه تنها الگوی آنزیمی ZP3 بدون ارتباط با سایر گروه ها و تقریباً به شکل Out group قرار گرفت. این شاخه دارای کمترین

میزان تشابه با سایر گروه های زایموگرمی بود. شاخه دیگر خود به دو زیر شاخه تقسیم می شد، زیر شاخه اول تنها با یک الگوی آنزیمی یعنی ZP5 و زیر شاخه دوم نیز خود به دو شاخه تقسیم می شد. در گروه اول الگوی آنزیمی ZP4 قرار گرفت و در گروه دوم نیز ZP1 و ZP2 با ۸۸/۲٪ تشابه در یک گروه قرار گرفتند و ZP6 در گروه دیگر قرار گرفت. آنالیز این دندروگرام میزان تشابه ژنتیکی بین جدایه های *R. solani* AG1-IA بدست آمده در استان گلستان را نشان می دهد.



شکل ۲- تشابه ژنتیکی بین گروههای زایموگرمی جدایه های *R. solani* AG1-IA حاصل از روش Group Average Analysis) بر اساس ضریب تشابه جاکارد.

Fig. 2. Genetic similarity between zymogram groups for the *R. solani* AG1-IA isolates generated by group average analysis with Jaccard Coefficient.

بحث

با توجه به نتایج آزمایشات انجام شده و بررسی های آناستوموزی، مشخص گردید که ۷۵ جدایه خالص سازی شده به گروه آناستوموزی AG1-IA تعلق داشتند. برداشت نمونه در دو سال متوالی نتایج مشابهی ارائه داد، اما فصل، شرایط اکولوژیکی و آب و هوایی بر روی نوسانات جمعیت قارچ در مزرعه اثرات مهمی داشت. یافته ها نشان داد که بیشترین درصد آلودگی مربوط به مزارع غربی استان و حومه گرگان بوده است که به نظر می رسد مهمترین

عامل آن همزمانی مرحله حساس گیاه (تشکیل غلاف به بعد) با رطوبت نسبی بالا و گرمای هوا در این مناطق بوده باشد. از مهمترین عوامل نبودن یا نادر بودن بیماری در نواحی شرقی استان گلستان را احتمالاً می توان پایین بودن رطوبت نسبی محیط، طی ماه های تیر - مرداد و شهریور در مقایسه با شهرستان های غربی استان دانست. این یافته ها با گزارشات قبلی که درجه حرارت لازم برای رشد قارچ *R. solani* AG1-IA را در روز از $26/60^{\circ}\text{C}$ تا $32/20^{\circ}\text{C}$ و در شب از $23/30^{\circ}\text{C}$ تا $27/7^{\circ}\text{C}$ و میزان رطوبت لازم برای رشد را ۹۵٪ بیان کرده بود (Rosewich *et al.* 1999) مطابقت داشت. پکتین زایمو گرم نشانگری مناسب برای مطالعه تنوع درون گروهی و اپیدمیولوژی قارچ ریزوکتونیا بوده است (Lecours *et al.* 1994; Reynold *et al.* 1983) و الکتروفورز با ژل اکریل آمید افقی پکتین (Cruickshank & Wade 1980) بعنوان روشی مناسب برای تفکیک انواع آنزیمهای پکتیکی معرفی شده است (Neat & Cruickshank 1988). آنالیزهای زایموگرایی در شناسایی گروه های درون گونه ای AG-8 (Sweetingham *et al.* , 1986) ، AG-4 (Balali and Kowsari, 2004) ، AG1-IA (Banniza & Rutherford 2001) و AG2 (Schneider *et al.* 1997) استفاده شده است. وجود تنوع هایی در قارچ *R. solani* AG1-IA قبلاً با نشانگر پکتین زایمو گرام و SSR (Banniza & Rutherford 2001) و همچنین نشانگرهای پروتئینی، چربی و نشانگر مولکولی rDNA (Tajik 2003) گزارش گردیده است. همچنین Rosewich و همکارانش در سال ۱۹۹۹ با استفاده از نشانگر RFLP جدایه های *R. solani* AG1-IA را مورد بررسی قرار دادند و چندین ژنوتیپ RFLP در نواحی مختلف شناسایی کردند که این ژنوتیپ ها از نظر فراوانی اختلاف نشان می دادند (Rosewich *et al.* 1999). یانگ (Yang 1994) پیشنهاد کرد که بیان آنزیم های پکتیک در جدایه های قارچ *R. solani* بوسیله چند لوکوس کنترل می شود و احتمالاً بین این لوکوسها در AG-8 ارتباطی وجود دارد. محمدی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ با بررسی پروتئین های محلول و ۶ ایزوآنزیم حضور دو زیر گروه AG1-IA و AG1-IB را در گروه زایموگرامی AG1 بیان نمودند (Mohammadi *et al.* 2003). حضور باندهای پلی گالاکتوروناز مختلف در تحقیق انجام شده، پیشنهاد می کند که، بیان آلل ها در لوکوس های مختلفی کنترل می شود. همچنین حضور باندهای مشترک شامل یک باند PE با مقدار *Rf* برابر با ۰/۰۵۳ و ۵

باند PG با Rf های ۰/۲۱۴-۰/۲۸۶ / ۰/۳۲۱-۰/۵۷۱ / و ۰/۶۲۵، ممکن است بیانگر این موضوع باشد که این لوکوس ها در AGI-IA *R. solani* حفظ شده و ثابت باقی مانده اند. لوکوس های متعدد می توانند چندین الگوی آنزیمی را بین جدایه های یک گروه آناستوموزی ایجاد کنند. بنابر این باید یک الگوی مشترک در باند های ثابت بعنوان الگوی زایموگرمی مشخص، برای ارتباط نزدیک جدایه ها در نظر گرفته شود و از اختلافات کوچک در Rf و باندهای ضعیف صرف نظر گردد. چون در تکنیک زایمو گرم تولید آنزیم پکتیک القا می شود، بنابراین ممکن است تولید آنزیم، بوسیله بافت یا شرایط غذایی یا حالت فیزیولوژیکی قارچ متاثر گردد. همچنین مقدار آنزیم های پکتیک در هنگام نمونه گذاری در ژل و سن ریشه های کشت شده در محیط مایع، بر روی وضوح و مقدار Rf باندهای تولید شده اثر می گذارد. بنابراین در طول تحقیق تمامی فاکتور های مذکور در نظر گرفته شد و شرایط بهینه فراهم گردید تا بتوان فنوتیپ های آنزیمی بدست آمده از قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج را در شرایط یکسان با یکدیگر مقایسه کرد. وجود میزبان اختصاصی برای هر گروه آناستوموزی می تواند بوسیله انشعاب هر گروه آناستوموزی از یک ذخیره ژنی مشترک توصیف گردد. بنابراین ممکن است تمایز ژنتیکی در هر گروه آناستوموزی بتدریج ایجاد شود و زیر گروه های زایمو گرمی مختلف ایجاد گردد. در آنالیزهای خوشه ای الگوهای زایمو گرمی (ZP) بر اساس فراوانی لوکوس های ایزوزایم پکتیک، مشاهده گردید که جمعیت های ZP1 و ZP2 دارای بیشترین میزان تشابه به یکدیگر هستند و در یک خوشه (Cluster) قرار می گیرند (شکل ۲). الگوهای زایمو گرمی ZP4 و ZP6 در یک شاخه اصلی تر قرار می گیرند که همراه با ZP1 و ZP2 با الگوی زایمو گرمی ZP5 خود انشعابی از یک شاخه اصلی تر هستند (شکل ۲)، نکته قابل توجه این که ZP5 که بصورت تنها و منفک تر از بقیه قرار گرفته در استان گلستان دارای کمترین مقدار فراوانی است. نهایتاً شاخه دیگر، ZP3، به شکلی کاملاً جدا و بصورت Outgroup قرار گرفته است (شکل ۲). ZP3 دارای بیشترین فراوانی در استان بوده در حالیکه کمترین میزان تشابه به سایر جمعیت ها را نشان می دهد. همچنین بر اساس داده های جدول ۱، جدایه مذکور دارای کمترین تعداد باند نیز می باشد (۱۱ باند). الگوی زایمو گرمی ZP3 قبلاً بوسیله محققین دیگر نیز معرفی شده بود (Banniza & Rutherford 2001). دور افتادگی چنین الگوی آنزیمی ممکن است

بیانگر ویژگی‌های اختصاصی هر جمعیت در منطقه اکولوژیکی خاص باشد. این یافته‌ها با یافته‌های انجام شده قبلی که بیان می‌نمود، ژنوتیپ‌های سازگارتر در مناطق، دارای فراوانی بیشتر بوده و شرایط اکولوژیکی در تنوع ژنتیکی جدایه‌ها نقش ایفا می‌کند، مطابقت داشت (Rosewich *et al.* 1999). تغییرپذیری در الگوهای آنزیمی بدست آمده، پیشنهاد می‌کند که ممکن است ارتباطی بین فعالیت آنزیم پکتیک و شدت بیماری ایجاد شده در جدایه‌های مختلف AGI-IA وجود داشته باشد، وجود چنین ارتباطی در مورد گروه آناستوموزی AG-4 قارچ *R. solani* بر روی گیاه لوبیا گزارش گردیده است (Balali & Kowsari 2004). ممکن است جدایه‌های دارای قدرت تخریب بیشتر، هتروکاریون‌هایی باشند که در بین هسته‌های آنها تنوع زیادی وجود دارد و *H-factor* در ایجاد چنین هتروکاریون‌هایی نقش مهمی ایفا کند. Carter و Puhalla (1976) بیان کردند که تشکیل هتروکاریون‌ها در جدایه‌های AG-I بوسیله یک لوکوس ژن هسته‌ای بنام *H-factor* که دارای آلل‌های چند گانه است کنترل می‌شود. بنابر این ممکن است هتروکاریون بودن و متعاقب آن رشد سریع تر ریشه‌ها، توان حیاتی بیشتری به قارچ ببخشد. شرط بقا تغذیه است و استفاده از میزبانهای مختلف و یا بافت‌ها و اندامهای گوناگون آن، چنین شرایطی را مهیا می‌سازد. نتیجه نهایی تغذیه بیمارگر، بیماری میزبان خواهد بود، بنابر این ممکن است *H-factor* بطور مستقیم یا غیر مستقیم در شدت و نوع بیماریزایی جدایه‌ها موثر باشد. یافته‌ها نشان داد که ارقام اصلاح شده به علت داشتن پنجه‌های زیاد و کوتاهی طول بوته نسبت به ارقام محلی که اغلب پا بلند و کم پنجه می‌باشند حساسیت بیشتری دارند و عکس‌العمل ارقام درمقابل این بیماری بیشتر تحت تاثیر عوامل مورفولوژیکی و اکولوژیکی می‌باشد این یافته‌ها با یافته‌های قبلی مطابقت داشت (Hori 1984). امید است با شناخت دقیق عامل بیماری و آگاهی از تنوع ژنتیکی و مکانیسم‌های بیماریزایی قارچ عامل بیماری، بتوان الگوهای صحیح و کاربردی برای مبارزه با بیماری سوختگی غلاف برنج ارایه داد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (5-8) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: مژگان کوثری و ام‌البنین باقری، موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی صندوق
پستی: ۱۸۹۷ - ۳۱۵۳۵ کرج و غلامرضا بلالی دانشکده علوم، گروه
زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و منصور صلاتی، موسسه تحقیقات آفات و
بیماری‌های گیاهی، گرگان

Archive of SID