

بررسی ثبات واحدهای SSR پلاسمید pEA29 جدایه‌های عامل بیماری سوختگی آتشی

ساره بقائی راوری^{*1} - الهام جمشیدی²

تاریخ دریافت: 1393/12/09

تاریخ پذیرش: 1394/04/29

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی ردیف‌های تکراری کوتاه (SSR) در ناحیه *PstI* پلاسمید pEA29 جدایه‌های *Erwinia amylovora* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف کشور و ارزیابی پایداری آن‌ها در شرایط آزمایشگاه انجام گرفته است. آزمون‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی تنوعی را در جدایه‌های مورد بررسی نشان ندادند. وجود پلاسمید pEA29 با استفاده از PCR آشیانه‌ای تایید و تکثیر و توالی یابی بخشی از ناحیه *PstI* حاوی واحدهای SSR برای تمام جدایه‌ها انجام گرفت. تعداد واحدهای تکراری برای جدایه‌های سیب و رز به ترتیب 4 و 8 عدد و برای جدایه‌های به، رز و زالزالک بین 4، 5 و 7 متغیر بودند. ثبات واحدهای SSR تحت سه تیمار تکثیر طولانی مدت، نگهداری جدایه‌ها در شرایط خنک و جداسازی مجدد از بافت‌های آلوده ارزیابی گردید و به جز جدایه IrGh59 تحت تیمار نگهداری طولانی مدت در سرما، در بقیه جدایه‌ها تغییری مشاهده نشد. بر اساس نتایج این تحقیق، تعداد واحدهای SSR به دلیل دارا بودن ثبات کافی در شرایط آزمایشگاهی، برای گروه‌بندی جدایه‌های عامل سوختگی آتشی قابل استفاده می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: ایران، پلاسمید pEA29، ثبات واحدهای تکراری، گروه‌بندی

مقدمه

یک قطعه از پلاسمید pEA29 به نام *PstI* که در محدوده 900 تا 1100 جفت باز انجام می‌شود (5). تفاوت در اندازه قطعه تکثیری در جدایه‌های مختلف به واسطه تعداد ردیف‌های تکراری کوتاه (SSR) هشت نوکلئوتیدی ATTACAGA است که بین 3 تا 15 بار بوده و برای طبقه‌بندی جدایه‌های *E. amylovora* استفاده می‌شود (3، 4، 10، 11 و 25). تنوع در تعداد واحدهای SSR می‌تواند به دلیل تغییر در بیان ژن و تاثیر بر فنوتیپ‌های کلیدی، به عنوان یک معیار مهم در انتخاب طبیعی و تکامل مطرح باشد (30). داده‌های SSR نسبت به سایر روش‌های تایپینگ تکرارپذیرتر هستند. ثبات واحدهای SSR بستگی به تعداد نوکلئوتیدها، ترکیب تکرارها و ساختارهای همسایه دارد. با این وجود نتایج متناقضی در ارتباط با ثبات واحدهای SSR در جدایه‌های *E. amylovora* گزارش شده است (11 و 27).

به منظور تعیین دقیق تعداد واحدهای تکراری موجود در pEA29 می‌توان از دو روش استفاده نمود. تکثیر قطعه *PstI* با استفاده از آغازگرهای A و B که در مطالعات پیشین انجام گرفته است (28). در مطالعه حاضر بخشی از ناحیه *PstI* پلاسمید pEA29 جدایه‌های ایرانی با استفاده از جفت آغازگرهای RS1 و RS2c با هدف بررسی ردیف‌های تکراری کوتاه مورد بررسی قرار گرفت. کارایی روش حاضر با روش تکثیری مربوط به کل محدوده *PstI* در تفسیر نتایج، مقایسه شد. همچنین ارزیابی پایداری واحدهای SSR در جدایه‌های مورد مطالعه تحت شرایط آزمایشگاه تحت 3 تیمار مختلف مورد آزمون قرار می‌گیرد.

بیماری سوختگی آتشی با عامل *Erwinia amylovora* از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی درختان میوه دانه‌دار در دنیا است، که خسارت‌های سنگین و غیر قابل جبرانی به محصولات باغی وارد می‌سازد (31). این بیماری در ایران برای نخستین بار در بهار 1368 روی گل‌ابی منطقه برغان کرج و سپس از نقاط مختلف کشور گزارش گردیده است (1، 19، 22، 24 و 29).

شباهت بالای جدایه‌های *E. amylovora* مربوط به دانه‌داران در کشورهای مختلف اروپایی و ایران بر اساس روش‌های ژنوتیپی، لزوم دستیابی به ابزار قوی تر جهت گروه بندی جدایه‌ها، برآورد چگونگی پراکنش بیماری و مطالعات اپیدمیولوژی را مشخص می‌نماید. به جزء در موارد نادر، تقریباً تمام جدایه‌های *E. amylovora*، دارای یک پلاسمید غیر قابل انتقال با اندازه‌ای در حدود 29 کیلو باز به نام pEA29 هستند (6). پلاسمید مذکور حاوی بیش از 21 چارچوب باز خواندن می‌باشد که تعدادی از آن‌ها بر اساس شباهت به پروتئین‌های پیش‌بینی شده در پایگاه‌های اطلاعاتی مشخص شده‌اند (15). تشخیص و ردیابی *E. amylovora* در بسیاری موارد با تکثیر

1 و 2- استادیار و دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
* - نویسنده مسئول: (Email: s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir)

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی و بررسی خصوصیات فنوتیپی

بیست جدایه از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور مربوط به استانها و میزبان‌های مختلف تهیه و بر روی محیط کشت آگار غذایی دارای 5 درصد سوکروز کشت شدند (جدول 1). ویژگی‌های فنوتیپی، آزمون‌های اولیه مانند OF، لوان، تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کشت King B، هیدرولیز توئین 20، احیای نیترات، رشد در 36 درجه سانتی‌گراد، تولید اسید از قندهای زایلوز و ادنیتول و آزمون فوق حساسیت درتوتون و شمعدانی بررسی شد (26).

اثبات بیماری‌زایی

از میوه‌های نارس گلایی پس از شستشو و ضدعفونی با اتانول 70 درصد، برش‌هایی با ضخامت 5 میلی‌متر تهیه و در سه تکرار داخل تشتک‌های حاوی کاغذ صافی آغشته به آب مقطر سترون قرار داده شدند. کشت 24 ساعته باکتری توسط خلال دندان سترون به برش‌های گلایی مایه‌زنی شد. تشتک‌ها در حرارت 28 درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شدند (20).

روش Lateral Flow Immune Chromatography

در این روش تشخیصی جدایه‌های باکتری، نوارهای Agri strip (Bioreba, Reinach, Switzerland)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده در 100 میکرولیتر از رقت‌های مختلف سوسپانسیون عصاره گیاهی که به طور مصنوعی تهیه گردید، قرار داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای جهت تشخیص عامل

بیماری

جهت استخراج DNA یک پرگنه باکتری 24 ساعته به میکروتیوپ 1/5 میلی‌لیتری حاوی آب مقطر دو بار سترون دارای 1 درصد توئین 20 منتقل و در حرارت 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه نگهداری شد. از سوسپانسیون مذکور به عنوان DNA الگو در واکنش PCR استفاده شد. در مرحله اول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دو آغازگر A و B که بر اساس قطعه تقریباً یک کیلو بازی از پلاسمید pEA29، حاوی ردیف‌های تکراری از باکتری *E. amylovora* طراحی شده‌اند (6)، انجام گرفت.

جدول 1- کد جدایه‌ها، محل جمع‌آوری و گیاه میزبان
Table 1. Isolates code, area of sampling and host plant

کد جدایه	محل جمع‌آوری	میزبان	سال جمع‌آوری	کد جدایه	محل جمع‌آوری	میزبان	سال جمع‌آوری
Isolate code	Sampling region	Host	Sampling year	Isolate code	Sampling region	Host	Sampling year
IrKh90	خراسان رضوی (Khorasan Razavi)	گلایی (Pear)	1392	IrT8	تبریز (Tabriz)	گلایی (Pear)	1385
IrS38	سمنان (Semnan)	سیب (Apple)	1385	IrT12	تبریز (Tabriz)	سیب (Apple)	1385
IrS36	سمنان (Semnan)	رز (Rose)	1385	IrGh59	قزوین (Ghazvin)	زالزالک (hawthorn)	1386
IrS32	سمنان (Semnan)	گلایی (Pear)	1385	IrGh65	قزوین (Ghazvin)	گلایی (Pear)	1386
IrZa18	زنجان (Zanjan)	سیب (Apple)	1385	IrGh64	قزوین (Ghazvin)	به (Quince)	1386
IrZa16	زنجان (Zanjan)	گلایی (Pear)	1385	IrU23	ارومیه (Uromia)	گلایی (Pear)	1385
IrL51	لرستان (Lorestan)	گلایی (Pear)	1386	IrU28	ارومیه (Uromia)	سیب (Apple)	1385
IrL53	لرستان (Lorestan)	به (Quince)	1386	IrIs10	اصفهان (Esfahan)	سیب (Apple)	1391
IrT2	تبریز (Tabriz)	به (Quince)	1386	IrIs11	اصفهان (Esfahan)	به (Quince)	1391
IrIs12	اصفهان (Esfahan)	زالزالک (hawthorn)	1391	IrKo14	کردستان (Kordestan)	سیب (Apple)	1390

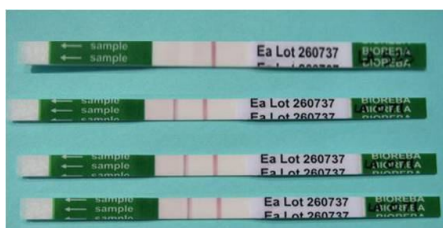
نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

کلیه جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری بودند. روی محیط کشت کینگ ب، پرگنه‌های شیری رنگ، لعابدار و فاقد رنگدانه فلورسنت ایجاد نمودند. جدایه‌ها در آزمون‌های هیدرولیز توئین 20، احیای نیترات و رشد در 36 درجه سانتی‌گراد منفی ارزیابی شدند. تمامی جدایه‌ها قادر به القاء واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی بودند و در محیط آیر از زایلوز اسید تولید نموده ولی قادر به استفاده از ادنیتول نبودند. نتایج حاصل از انجام آزمون‌های فنوتیپی با داده‌های حاصل از آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی تطابق داشته و تنوع خاصی نشان ندادند (8 و 26). بر این اساس جدایه‌های تحقیق حاضر به عنوان *E. amylovora* مورد تایید قرار گرفتند.

آزمون بیماری‌زایی

علائم بیماری بعد از 4 تا 5 روز و به صورت تشکیل لکه‌های آسبوخته در اطراف محل‌های زخم مشاهده گردید که با گذشت زمان، لکه‌ها قهوه‌ای شده و به هم پیوستند. در برخی موارد ترشح اووز باکتریایی روی سطح ورقه میوه، مشاهده گردید. گلابی‌هایی که توسط آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند، هیچ گونه علائمی نشان ندادند. با توجه به نتایج حاصل از این آزمون، کلیه جدایه‌های مایه‌زنی شده از لحاظ بیماری‌زایی تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند که با نتایج دیگران مطابقت داشت (10، 26 و 32).



شکل 1- آزمون ایمنولوژیکی نوارهای آگری تشخیصی بیمارگر *E. amylovora* نشان دهنده تعامل مثبت بین آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی Ea می‌باشد. نوار اول از بالا مربوط به گیاه سالم و سه نوار بعدی مربوط به گیاهانی است که به طور مصنوعی آلوده شده‌اند.

Figure 1- Immunological Agri Strips detecting *E. amylovora* based on interaction between antigen and specific antibody of Ea. First line from above is related to healthy plant and the other three lines indicated artificially infected plants.

سنجش Lateral Flow Immune Chromatography

روش LFIC حداکثر در مدت زمان 15 دقیقه قادر به ردیابی

مخلوط واکنش 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 10x، 1/5 میلی مولار کلرور منیزیم (MgCl₂)، 10 پیکومول از هر یک از آغازگرها، 0/2 میلی مولار dNTPs، 0/5 میکرولیتر DMSO، 2 واحد آنزیم تک پلیمرز (سیناژن، تهران) و 2 میکرولیتر از DNA الگو در دستگاه ترمو سایکلر Biometra (آلمان) انجام گرفت. جهت انجام RCP آشیانه‌ای، یک میکرولیتر از فرآورده حاصل از دور اول PCR به 24 میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی آغازگرهای AJ75/AJ76، اضافه گردید (18). یک واکنش بدون اضافه کردن DNA ژنومی به عنوان شاهد منفی برای کنترل آلودگی در کنار نمونه‌ها در نظر گرفته شد. جدایه مرجع Ea273 نیز به عنوان شاهد مثبت در کلیه واکنش‌ها استفاده شد. فرآورده‌های حاصل به همراه سایز مارکر 3kb (Fermentas, Lithuania) بر روی ژل آگارز 1/2 درصد بررسی شدند.

تکثیر و توالی‌یابی قطعه‌ای از پلاسمید pEA29 حاوی

توالی‌های کوتاه DNA

آنالیز توالی‌های کوتاه DNA در پلاسمید pEA29، در جدایه‌های Ea با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی (5'-ACCTCAGTGCATTACAG-3' RS1 و 5'-GTCCATTCTGTGTAAG-3' RS2c) با حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام گرفت (12). برای کنترل آلودگی و صحت انجام آزمایش، یک واکنش با اضافه کردن آب مقطر سترون و بدون استفاده از DNA (به عنوان شاهد منفی) در کنار سایر نمونه‌ها در نظر گرفته شد. قطعات تکثیر شده از ده جدایه منتخب Ea بعد از خالص‌سازی با کیت QIAquick (کیاژن، آمریکا) و همسانه‌سازی در پلاسمید pGEM-T (Promega)، جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) فرستاده شد. پس از توالی‌یابی، تعداد واحدهای SSR برای جدایه‌های نماینده ارزیابی شد.

ارزیابی ثبات واحدهای SSR در پلاسمید pEA29

پنج جدایه نماینده از میزبان‌های مختلف انتخاب شدند. هر کدام از جدایه‌ها تحت سه تیمار آزمایشگاهی جداگانه قرار گرفتند. تیمارها شامل تکثیر بلند مدت جدایه‌ها به صورت انتقال جدایه‌ها به محیط نوترینت آگار جدید دو بار در هفته و به مدت 3 ماه (25)، نگهداری کلنی‌ها در محیط نوترینت آگار در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 ماه و جداسازی باکتری بعد از دو هفته از گلابی‌هایی که به صورت مصنوعی آلوده شده بودند (11)، انجام شد. در پایان هر آزمایش جدایه‌ها تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار گرفته و تعداد واحدهای SSR با توالی‌یابی مجدداً مشخص گردید.

ردیابی صورت می‌گیرد. استفاده از این روش بسیار حساس، باعث تشخیص بسیار سریع بیمارگر در گیاهان بدون علائم نیز می‌شود (14).

حضور یا عدم حضور پلاسمید pEA29 در تولید اووز و ایجاد نکروز گسترده‌تر در آزمون بیماریزایی نقش تعیین کننده‌ای دارد (20). به نظر می‌رسد پلاسمید pEA29 قادر به تغییر در متابولیسم سلول باکتری و تنظیم تولید آمیلووران، ترشح لوان سوکروز و کنترل بیماریزایی در گیاه میزبان با توجه به شرایط محیطی و دوره زندگی میزبان باشد (17، 20، 23 و 33). جدایه‌های بدون پلاسمید pEA29 بیماریزایی تقلیل یافته را همراه با تاخیر در توسعه علائم روی نهال‌های سیب و برش‌های گلایی نارس و مهاجرت کند در برگ را موجب می‌شوند (2 و 9).

تکثیر و توالی یابی قطعه ای از پلاسمید pEA29 حاوی واحدهای SSR

واکنش زنجیره ای پلیمرز با جفت آغازگرهای اختصاصی RS1 و RS2c منجر به تکثیر قطعه ای در محدوده 90 تا 130 جفت باز برای تمام جدایه ها گردید. قطعه بدست آمده با اندازه قطعه گزارش شده در منابع که در دامنه 95 تا 183 است مطابقت دارد (10، 11 و 12).

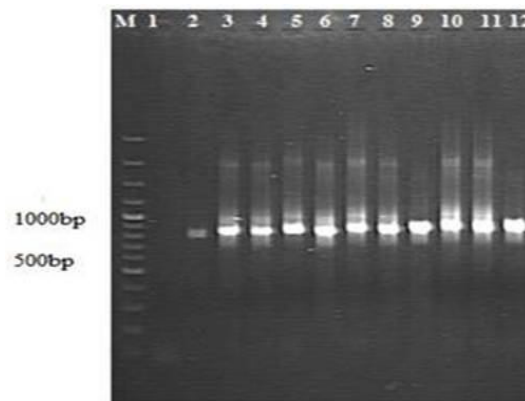
DNA تکراری در ژنوم پروکاریوت ها مرتبط با سازگاری و تنوع فازی باکتریایی می باشد (30). بررسی توالی آمینو اسیدی چارچوب باز خواندن مجاور ناحیه موتیف SSR، شباهت این توالی را به پروتئین های درگیر در همانندسازی پلاسمید مشخص نموده است. احتمالاً واحدهای تکراری در تنظیم همانندسازی و تقسیم پلاسمید نقش دارند (11 و 30).

به منظور تعیین دقیق تعداد واحدهای تکراری موجود در pEA29 می‌توان از دو روش استفاده نمود. تکثیر قطعه *PstI* با استفاده از آغازگرهای A و B در بررسی‌های پیشین انجام گردیده است (28). در مطالعه حاضر قطعه حاوی واحدهای تکراری به وسیله آغازگرهای RS1 و RS2c تکثیر، همسانه‌سازی و توالی یابی گردید. هم‌ردیف‌سازی ناحیه SSR جدایه‌های نماینده از هر میزبان در شکل 3 مشخص شده است. جدایه‌های نماینده *Irs38*، *Irs11* و *Irs12* به همراه جدایه استاندارد Ea273 دارای تعداد واحد تکراری 4 می‌باشند. هم‌چنین جدایه *IrGh65* با 5 تکرار، جدایه *IrS36* با 8 تکرار و جدایه *IrL51* با 7 تکرار به عنوان نماینده در هم‌ردیف سازی قابل مشاهده هستند (شکل 3). استفاده از آغازگرهای A و B به لحاظ این که کل محدوده قطعه مورد مطالعه را در بر گرفته و امکان بررسی توالی‌های مجاور بخش‌های تکراری را نیز مهیا می‌سازد، ارجحیت دارد.

$10^5 - 10^6$ CFU/ml باکتری در عصاره گیاهی آلوده می‌باشد. در تمام جدایه‌ها دو باند صورتی رنگ روی نوارهای Agri strip طبق دستورالعمل، تشکیل شد که نشان دهنده حضور باکتری *E. amylovora* بود (شکل 1). روش تشخیصی سرولوژیکی LFIC به عنوان یک روش تشخیصی سریع و بدون نیاز به تجهیزات گسترده آزمایشگاهی استفاده می‌شود (7 و 21).

تشخیص جدایه‌های *E. amylovora* به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز

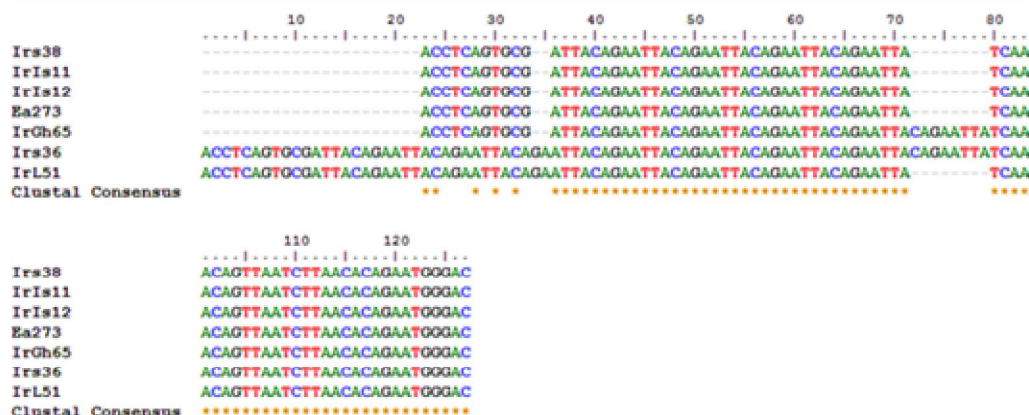
کلیه جدایه‌های مورد مطالعه در آزمون PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی A/B قطعه حدود 1000 تا 1050 جفت بازی تکثیر نمودند. پلاسمید مذکور اطلاعات مربوط به بیوسنتز تیامین و چندین ژن منتخب که بیماریزایی و بقاء باکتری در گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد را کد گذاری می‌کند و به طور اختصاصی در تمام جدایه‌های *E. amylovora* وجود دارد (6 و 16).



شکل 2- تکثیر قطعه اختصاصی جدایه های Ea با استفاده از آغازگرهای AJ75 و AJ76. ترتیب چاهک ها از 1 تا 12: آب مقطر، *IrZa16*، *IrS38*، *IrZa18*، *IrT12*، *IrU23*، *IrS36*، *IrS11*، *IrGh65*، *IrT2*، *IrS10*، *IrS12*،

Figure 2- Amplification of specific fragment of Ea strains using AJ75/AJ76 primers. Order of wells from 1 to 12 consists of distilled water, *IrS11*، *IrS36*، *IrU23*، *IrT12*، *IrZa18*، *IrS38*، *IrZa16*، *IrS12*، *IrS10*، *IrT2*، *IrGh65*

فرآورده حاصل از PCR با آغازگرهای اختصاصی A/B، بعنوان DNA الگو با جفت آغازگرهای اختصاصی AJ75/AJ76 در آزمون PCR آشیانه‌ای به کار رفتند و قطعه‌ای حدود 800 تا 820 جفت باز تکثیر گردید (شکل 2). قطعه تکثیر شده با اندازه قطعه گزارش شده در منابع مطابقت دارد (14 و 16). اکثریت جدایه‌ها در محدوده 780 تا 800 جفت باز تولید قطعه مورد نظر را نمودند. سیستم PCR آشیانه‌ای 100 تا 1000 برابر حساستر از PCR استاندارد می‌باشد بگونه‌ای که با میزان اندکی نمونه گیاهی، DNA و یا محصول PCR مربوطه،



شکل 3- هم‌ردیف‌سازی ناحیه SSR جدایه‌های نماینده از میزبان‌های مختلف به همراه جدایه استاندارد Ea273 در برنامه BioEdit
 Figure 3- Alignment of SSR region of representative isolates obtained from different hosts in addition to Ea273 in BioEdit program.

بررسی مقاومت به سولفات مس، نگهداری در درجه حرارت پایین و یا مایه زنی به گیاه و جداسازی مجدد (27)، می‌تواند منجر به تغییر گردد که این امر معمولاً به خاطر تنظیم سازگاری باکتری نسبت به فشارهای محیطی می‌باشد. بر اساس بررسی‌های گروه اخیر، جدایه‌هایی که تعداد کپی بیشتری از DNA تکراری را در پلاسمید خود حمل می‌کنند، با نرخ بیشتری دچار تغییر در تعداد کپی در شرایط مختلف می‌گردند و جدایه‌هایی با تعداد کپی کمتر در طی سال‌های مختلف دچار تغییر نمی‌شوند. علت وجود این ناپایداری می‌تواند نوترکیبی همولوگ بین کپی‌های تکراری در یک پلاسمید باشد. تعداد زیادی از محققین روش بررسی واحدهای SSR را دارای ثبات کافی در تمایز بین جدایه‌های *E.amylovora* می‌دانند و معتقدند تعداد SSR تحت شرایط آزمایشگاهی و موقعیت‌های تنش‌زای اختصاصی به جز در موارد اندک، پایدار است، و می‌تواند جهت گروه‌بندی و دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد پراکنش جدایه‌های Ea استفاده گردد (4، 11، 13 و 25). پایداری تعداد SSRها تحت شرایط طبیعی در مورد جدایه‌های مربوط به سال‌های مختلف در تحقیقات مختلفی گزارش شده است (25). بر اساس داده‌های مطالعه حاضر، جهت بررسی دقیق تعداد واحدهای تکراری پلاسمید pEA29 جدایه‌های *E.amylovora*، تکثیر کل قطعه *Pst*I ضرورت دارد و می‌تواند در تفسیر بهتر نتایج موثر باشد. هم‌چنین تعداد واحدهای SSR دارای ثبات کافی تحت شرایط آزمایشگاهی است و در گروه‌بندی جدایه‌های عامل سوختگی آتشی می‌تواند استفاده شود.

تعداد واحدهای تکراری متفاوت برای میزبان یکسان مربوط به مناطق جغرافیایی و سال‌های مختلف در ارزیابی جدایه‌های *E.amylovora* بلغارستان مشاهده گردید (3). در مطالعه حاضر جدایه‌های بدست آمده از گلابی، به و زالزالک مربوط به سال‌های متفاوت، دارای واحدهای تکراری 4، 5 و 7 می‌باشند. این موضوع می‌تواند دلالت بر این داشته باشد که تحت شرایط طبیعی، علائم بیماری سوختگی آتشی ممکن است توسط مخلوطی از جدایه‌های *E.amylovora* دارای تعداد SSR متفاوت ایجاد گردد و وجود هم‌زمان جدایه‌های متمایز از هم یا تغییر در جمعیت بیمارگر را باعث شود.

بررسی ثبات توالی هشت جفت بازی ناحیه SSR

ثبات واحدهای SSR تحت سه تیمار، تکثیر طولانی مدت، نگهداری جدایه‌ها در شرایط خنک و جداسازی مجدد از بافت‌های آلوده انجام گرفت. انتقال مکرر جدایه‌ها به محیط نوترینت آگار جدید بعد از گذشت سه ماه تغییری در تعداد واحدهای تکراری ایجاد نمود. هم‌چنین در تعداد واحدهای SSR در تیمار جداسازی مجدد از بافت‌هایی که به طور مصنوعی آلوده شده‌اند نیز تغییری مشاهده نگردید. در حالی که در جدایه IrGh59، تیمار قرارگیری در شرایط یخچال به مدت سه ماه و کشت روی محیط تازه، منجر به تغییر تعداد واحد SSR از 7 به 6 شد.

در رابطه با ثبات واحدهای تکراری در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی مختلف اختلاف نظر وجود دارد. عده‌ای معتقدند شرایطی هم‌چون موتاسیون خودبخودی روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک،

منابع

- 1- Afunian M.R., Mohammadi M., and Rahimian H. 2000. Phenotypic characterization of Iranian strains of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease of pome trees. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 31: 463-476.
- 2- Aldridge P., Metzger M., and Geider K. 1997. Genetics of sorbitol metabolism by *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. Molecular and General Genetics, 256: 611-619
- 3- Atanasova L., Kabadjova-Hristova P., Stefanova K., Bogatzevska N., and Moncheva P. 2009. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains from Bulgaria by PCR-RFLP analysis. European Journal of Plant Pathology, 124: 451-456.
- 4- Barionovi D., Giorgi S., Stoeger A.R., Ruppitsch W., and Scortichini M. 2006. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short sequence DNA repeat of plasmid pEA29. Journal of Applied Microbiology, 100: 1084-1094.
- 5- Bereswill S., and Geider K. 1997. Characterization of the rcsB gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. Journal of Bacteriology, 179: 1354-61.
- 6- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., and Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3522-3526.
- 7- Braun-Kiewnick A., Vogelsanger J., Schoch B., Franck L., Holliger E., Duffy B., Altenbach D., Oberhansli T., and Bitterlin W. 2009. Ea AgriStrip- a new rapid test for detection of fire blight. Obst-und Weinbau. 145: 7-10
- 8- Geider K., Auling G., Jakovljevic V., and Volksch B. 2009. A polyphasic approach assigns the pathogenic *Erwinia* Strains from diseased pear trees in Japan to *Erwinia pyrifoliae*. Letters in Applied Microbiology, 48: 324-330.
- 9- Geier G., Geider K. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 42: 387-404.
- 10- Jock S., Jacob T., Kim W.S., Hildebrand M., Vosberg H.P., and Geider K. 2003. Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. Molecular Genetics and Genomics, 268: 739-749.
- 11- Kim W.S., and Geider K. 1999. Analysis of variable short sequence DNA repeats on the 29 kp plasmid of *Erwinia amylovora* strains. European Journal Plant Pathology, 105: 703-713.
- 12- Kim W.S., Hildebrand M., Jock S., and Geider K. 2001. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Microbiology, 147: 2951-2959.
- 13- Lecomte P., Manceau C., Paulin J.P., and Keck M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEa29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal Plant Pathology, 103: 91-98.
- 14- Llop P., Bonaterra A., Pen alver J., and Lopez M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology, 66: 2071-2078.
- 15- Llop, P., Barbe, S., and Lopez, M. M. 2012. Functions and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees. Tress, 26:31-46.
- 16- McGhee G.C., and Jones A.L. 2000. Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4897-4907.
- 17- McGhee G.C., and Sundin G.W. 2007. Thiamin biosynthesis and its influence on exopolysaccharide production: a new component of virulence identified on *Erwinia amylovora* plasmid pEA29. Acta Horticulturae, 793: 271-277.
- 18- McManus P.S. , and Jones A.C. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot blot and reverse blot hybridization. Phytopathology, 85: 618-623.
- 19- Moarefzade N., Mohammadi M., Sharifi Tehrani A., and Zakeri Z. 2009. Efficiency of some serological and PCR based methods in detection of casual agent of fire blight in fruit trees. Iranian Plant Protection Scienc, 40: 55-64.
- 20- Mohammadi M. 2010. Enhanced colonization and pathogenicity of *Erwinia amylovora* strains transformed with the near-ubiquitous pEA29 plasmid on pear and apple . Plant Pathology, 59: 252-261.
- 21- Moslemkhani C., and Sadeghi L., 2011. Comparison and development of new method for detection of *Erwinia amylovora* in latent infection plant material. Iran. Journal Plant Pathology, 47: 155-156.
- 22- Niknejad Kazempour M., Kamran E., and Ali B. 2006. *Erwinia amylovora* Causing fire blight of pear in the Guilan province of Iran. Journal of Plant Pathology, 88: 113-116.
- 23- Oh C.S., and Beer S.V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 253: 185-192.
- 24- Omidvar R., Shamsbakhsh M., and Rahimian H. 2006. Determination *Erwinia amylovora* features using biochemical and RAPD methods. Iran Journal Plant Pathology, 42: 673-686.
- 25- Ruppitsch W., Stöger A., and Keck M. 2004. Stability of short sequence repeats and their application for the

- characterization of *Erwinia amylovora* strains. FEMS Microbiology Letters, 234:1-8.
- 26- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul M.N., USA. 158 pp.
- 27- Schnabel E.L., Jones A.L. 1998. Instability of a pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. Plant Disease, 82: 1334-1336.
- 28- Taghdareh Gh., Baghaee-Ravari S., Moslemkhani C., and Mahdikhani, E. 2014. Evaluation of repeat sequences on plasmid pEA29 of *Erwinia amylovora* from Iran. European Journal of Plant Pathology, 140:735-744.
- 29- Tavakol Bakhoda Sh., and Taghavi M. 2010. Phenotypic and genotypic features of *Erwinia amylovora* from different hosts in Shiraz. Iranian Plant Protection Science, 41: 29-40.
- 30- Van Belkum A., Scherer S., Van Alphen L, and Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiol. Molecular Biology Reviews, 62: 275-293.
- 31- Van der Zwet T., Bonn W.G. 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae, 489: 167-168.
- 32- Vanneste J.L. 1995. *Erwinia amylovora*. PP. 21-41. In: Singh. U.S., R.P. Singh and k. Kohmato (Eds.) Pathogenesis and host specificity in Plant Disease: Histopathological, Biotechnical, Genetic and Molecular Bases. Vol. 1. Prokaryotes, Progamon Press., Oxford. London.
- 33- Zhao Y.F., Blumer S. E., and Sundin G.W. 2005. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. Journal of Bacteriology, 187: 8088-8103.