



## بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بلاست مرکبات در غرب مازندران و شرق گیلان

سمانه سمیعی شیرکده<sup>۱</sup> - مرتضی گل محمدی<sup>۲\*</sup> - سید علی الهی‌نیا<sup>۳</sup> - سمانه بشیری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

### چکیده

بیماری بلاست یکی از بیماری‌های شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت مرکبات از جمله شمال ایران می‌باشد که عمدتاً به‌وسیله جدایه‌های باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) ایجاد می‌شود. به‌منظور بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *Pss* عامل بیماری، نمونه‌برداری از درختان مرکبات در غرب مازندران و شرق گیلان طی ماه‌های اسفند ۱۳۹۰ تا اوایل خرداد ۱۳۹۱ صورت گرفت. جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند که تعداد ۲۷ جدایه باکتری از بافت‌های آلوده بر اساس آزمون‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی به‌عنوان *Pss* شناسایی و جدا شدند. جهت تأیید شناسایی جنس و گونه باکتری از روش مولکولی (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی باکتری مربوط به ژن اختصاصی تولید سیرینگومایسن استفاده گردید. تمامی جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی قطعه قابل انتظار ۱۹۸ جفت بازی از ژن *syTB* را تولید کردند. انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌ها به روش rep-PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP انجام شد. نتایج به‌دست آمده از دندروگرام تلفیق نقوش الکتروفورز حاصل از آغازگرهای ERIC و REP نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۵ درصد در ۶ گروه قرار گرفتند. علی‌رغم وجود خصوصیات فنوتیپی مشابه، نتایج بیانگر وجود ناهمگونی از نظر ژنتیکی در بین جدایه‌های *Pss* عامل بلاست مرکبات در غرب مازندران و شرق گیلان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انگشت‌نگاری، تنوع ژنتیکی، *Pss*، rep-PCR

### مقدمه

*P. s. viridiflava* و در نواحی دیگری از استان *P. s. syringae* pv. *syringae* باشد (۲۶). هم‌چنین به بررسی فنوتیپی و بیماری‌زایی عوامل بیماری بلاست مرکبات در استان‌های شمالی ایران پرداخته شد که در این بررسی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، جدایه‌ها در ۱۶ گروه مجزا قرار گرفتند و حدود ۳۹ و ۳ درصد از کل جدایه‌ها به‌ترتیب به‌عنوان *P. viridifalva* و *P. syringae* شناسایی شدند (۳). این بیمارگر از طریق زخم ایجاد شده روی بافت‌های جوان به گیاه حمله می‌کند. نشانه‌های بیماری بلاست روی پهنک و دم‌برگ عموماً به صورت نقاط آبرسخته یا نواحی سیاه رنگ ظاهر شده سپس از هر طرف گسترش یافته به‌طوری که از طرف پایین به شاخه و از طرف بالا به بخش فوقانی برگ سرایت می‌کند. در صورت آلودگی آوندهای آبکشی دم‌برگ، برگ‌ها پژمرده شده و آویزان به درخت باقی می‌مانند و در صورت آلودگی شدید نهال‌ها، برگ‌ها می‌ریزند. در محور جوانه با قاعده برگ زخم بیضی شکل قهوه‌ای تا سیاه رنگی ایجاد می‌شود. اگر این لکه‌ها دور تا دور شاخه را بگیرند، بخش‌های بالایی آن‌ها خشک خواهد شد (۳۱).

بیماری بلاست مرکبات یکی از بیماری‌های باکتریایی رایج و خسارت‌زا در باغ‌های مرکبات در استان‌های گیلان و مازندران است که بررسی کمی روی آن صورت گرفته است. نخستین بار این بیماری در سال ۱۳۶۶ به‌صورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها از شمال ایران گزارش گردید (۲۶). سپس به مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی عامل بیماری در غرب مازندران پرداخته شد که عامل بیماری، پاتووار *P. s. pv. Syringae* معرفی شد (۱۰ و ۷). این احتمال وجود دارد که باکتری عامل بیماری در بعضی از نقاط مازندران

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

\*- نویسنده مسئول: (Email: Mgolm2009@gmail.com)

۴- دانشجوی دکتری قارچ شناسی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان

جدایه‌های شبه *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر را از جدایه‌های عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و سوختگی برگ غلات متمایز سازند (۲۰). تحقیق حاضر به‌منظور بررسی تکمیلی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی جدایه‌های *Pss* عامل بلاست مرکبات در غرب مازندران و شرق گیلان و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pss* به‌دست آمده از مرکبات با استفاده از نشانگرهای REP و ERIC صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌ها

نمونه‌برداری طی ماه‌های اسفند ۱۳۹۰ تا اوایل خرداد ۱۳۹۱ از باغ‌های آلوده مرکبات واقع در غرب مازندران و شرق گیلان صورت گرفت. نمونه‌ها، از درختان مرکبات با ظاهری آلوده و سرشاخه‌های دارای نشانه‌های بیماری گردآوری و در پاکت پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جداسازی برگ‌ها، شست‌وشو و ضدعفونی سطحی با آب استریل و الکل ۷۰٪ صورت گرفت. بعد از آبکشی مجدد ساقه آلوده، از حدواسط بافت سالم و خشک شده، قطعات کوچکی به اندازه ۵ میلی‌متر تهیه شد و در محلول آب مقطر استریل + ۱٪ توین ۲۰ به مدت یک ساعت روی شیکر با دور ۱۲۰rpm قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل پس از رقیق‌سازی روی محیط‌های King'B medium (KB) و Nutrient Agar (NA) کشت خطی شدند. تست‌های پتری حاوی پرگنه‌های باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس پرگنه‌های مشابه پرگنه‌های *P. s. pv. syringae* که به رنگ کرم متمایل به شیری، اندازه کوچک و توانایی تولید رنگ فلورسنت در محیط KB جداسازی شدند و جهت آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی بعدی در دو تیوپ ۱/۵ میکرولیتری جداگانه در ۲۰°C - نگهداری شدند.

### آزمون‌های بیماری‌زایی و فنوتیپی

آزمون واکنش فوق حساسیت در برگ‌های توتون بر اساس روش کلمنت و همکاران (۱۴) انجام شد. برای اثبات بیماری‌زایی روی برگ، سرشاخه‌های دارای برگ‌های سالم انتخاب و سطح برگ‌ها با پنبه آغشته به اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. آنگاه به وسیله سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^7$  سلول در میلی‌لیتر روی سطح برگ‌ها با روش تزریق مایه‌زنی گردید (۳۲). برای تیمار شاهد نیز از آب استریل به‌جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای ۲۰°C نگهداری شدند. آزمون اکسیداز به روش کواکس (۱۵)، آزمون لووان و لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، واکنش گرم، فعالیت کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، نشاسته، توین ۸۰ و

یکی از پاتوارهای مهم *P. syringae* که قادر است در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی از جنس‌های متفاوت ایجاد بیماری کند، *P. s. pv. Syringae* می‌باشد (۴). معمولاً در گذشته از آزمون‌های بیوشیمیایی و نیز نشانه‌های ایجاد شده روی گیاه میزبان جهت تشخیص سویه‌های *P. s. pv. syringae* استفاده می‌شد که در بسیاری از موارد *P. syringae* با استفاده از این مشخصات به‌عنوان پاتوار *P. s. syringae* شناسایی شد که ارتباط میزبانی با دیگر سویه‌های *P. s. pv. syringae* نداشت (۱۱). در یک مطالعه، ۷۷ سویه از هشت پاتوار گونه *P. syringae* را مورد بررسی فنوتیپی قرار دادند و مشخص گردید که پاتوارها بسیار به یکدیگر نزدیک بوده و تفکیک آن‌ها مشکل است (۱۳). بنابراین روش‌های بیوشیمیایی ارتباط بین پاتوارهای *P. s. pv. syringae* جدا شده از میزبان‌های مختلف را مشخص نمی‌کند و برای نشان دادن تفاوت‌های تعیین کننده در سطح پاتوار چندان اطمینان بخش نیست (۹ و ۱۱). همچنین صفات مبتنی بر متابولیسم سلولی و بیماری‌زایی از کارایی لازم برای مطالعات دقیق‌تر برخوردار نمی‌باشند (۳۴). ضمن آن که آزمون‌های بیماری‌زایی انجام گرفته در شرایط گلخانه در مقایسه با محیط طبیعی دارای تفاوت‌هایی بوده و مطالعات تکمیلی نیاز است (۵ و ۱۱). آنالیز مولکولی ژنوم باکتری‌ها این قابلیت را دارد که تفاوت‌های زیرگونه‌ای را به‌خوبی مشخص نماید. استفاده از آغازگرهای اختصاصی با توجه به سهولت کار، حساسیت بالا و سرعت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌عنوان روش مؤثری در شناسایی پاتوارهای نزدیک به هم مورد توجه قرار گرفته است (۳۰). همچنین استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر ژن *syrb* را به‌عنوان روش سریع و مفید در ردیابی این جدایه معرفی شده است (۲۷). وینگارت و ولکچ (۳۰) روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای به نام ERIC<sup>۱</sup>، REP<sup>۲</sup> و BOX<sup>۳</sup> را برای تعیین تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* معرفی کردند. این توالی‌ها، نواحی‌های کوچک تکراری در DNA می‌باشند که به صورت دست‌نخورده در تمام ژنوم گونه‌های مختلف باکتریایی وجود دارند (۲۸). با طراحی آغازگر از روی این توالی‌ها و آزمون PCR می‌توان جدایه‌ها را به‌صورت اختصاصی انگشت‌نگاری نموده و تفاوت جدایه‌ها را در حد گونه و زیرگونه مشخص نمود (۵ و ۱۸). در ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. s. pv. syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در چند استان شمالی ایران با استفاده از آغازگرهای REP و ERIC، نتایج نشانگر وجود تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های *Pss* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار بود (۱). همچنین با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و ERIC2 توانستند

- 1 - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
- 2- Repetitive Extragenic Palindromic
- 3- Based Repetitive Extragenic Palindromic

جدول ۱ آورده شده است. ترکیب واکنش PCR به مانند روش فوق الذکر بود با این تفاوت که در این مرحله آغازگرهای ERIC و REP به کار برده شد. برنامه‌ی دمایی برای REP-PCR (۳۵) به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۴۰°C و ۸ دقیقه در ۶۵°C و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۶۵°C و برنامه دمایی برای ERIC-PCR (۱۷) به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۵۲°C و ۸ دقیقه در ۶۵°C و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۶۸°C مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP به روش اشاره شده، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک و نقوش الکتروفورزی حاصل شد.

#### آنالیز داده‌ها

تمامی جدایه‌ها بر اساس الگوی بانندی مشاهده شده به روش باینری (صفر و یک) نمره‌دهی شدند و داده‌های به دست آمده به صورت ماتریکس در نرم‌افزار Excel وارد شدند. سپس جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، به کمک اطلاعات به دست آمده دندروگرام‌های نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار NTsys 2.02 و الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه سیمپل مچینگ (Simple) machining رسم گردید (۲۴).

کازئین، رشد هوازی/بی‌هوازی، تولید اوره آز، آرژنین د هیدرولاز و تولید سیرینگومایسین، احیای نیترات، رشد در نمک طعام ۵ و ۶ درصد، تولید رنگدانه فلورسنت، آزمون توانایی استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط معدنی پایه آیر (Ayer) به روش شاد و همکاران (۲۵) انجام شد.

#### واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز

به منظور تأیید مولکولی جنس و گونه جدایه‌های شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و بیماری‌زایی، PCR به کمک جفت آغازگرهای اختصاصی *syrb* انجام شد. حجم محلول واکنش PCR شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR، ۰/۲ مولار dNTP، ۱/۲۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۲ واحد Taq DNA Polymerase، ۰/۲ میلی‌مولار از هر کدام از آغازگرها، بود. مستقیماً از پرگنه خالص باکتری که قطر آن حدود ۱-۲ میلی‌متر بود به مقدار کم، با خلال دندان استریل برداشته و به آرامی به واکنش PCR اضافه گردید و حجم واکنش با آب دیونیزه شده به ۲۵ میکرولیتر رسانده (۱۷ و ۲۵) و تکثیر به کمک دستگاه ترموسایکلر (MJ Research- PTC- 200) و برنامه‌ای به این قرار انجام شد (چاپ نشده): واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۴۰ ثانیه در ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در ۵۸°C، ۴۰ ثانیه در ۷۲°C و یک چرخه انتهایی به مدت ۴ دقیقه در ۷۲°C. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. s. syringae* pv. *syringae* به دست آمده از سطح مناطق نمونه‌گیری و ۳ جدایه دریافتی از اسپانیا (IVIA)، از انگشت‌نگاری ژنومی rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP و ERIC استفاده شد. توالی آغازگرها در

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR

Table 1- Name and sequence of primers used in PCR

نام آغازگر	توالی	
Primers	Sequence	
ERIC	ERIC1R ERIC2	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3' 5'-ICG ICT TAT CIG GGC TAC-3'
REP	REP1-I REP2-I	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC-3' 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
SYRB	SYRBF SYRBR	5'- AATTCGCCTTAACTGCGGAACAGC-3' 5'- ATCATAGTTGGCGATGTTGGTGCC-3'

روی برگ توتون (شکل ۱) بودند، انتخاب و سایر خصوصیات فنوتیپی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. مشخصات مربوط به جدایه‌ها به همراه ۳ جدایه دریافتی از اسپانیا (IVIA) در جدول ۲ آمده است. جدایه‌ها کاتالاز مثبت و اکثراً دارای رشد هوازی بودند. هیدرولیز ژلاتین، اسکولین در همه آن‌ها مثبت بود. تولید اوره آز، هیدرولیز نشاسته در همه جدایه‌ها منفی بود. قابلیت هیدرولیز توئین ۸۰ در بین جدایه‌ها متغیر بود. جدایه‌ها توانایی تحمل نمک طعام ۵ درصد را داشتند ولی نتوانستند روی محیط نمک طعام ۶ درصد نمک طعام رشد کنند.

#### نتایج و بحث

##### جداسازی، خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی

در این بررسی از تعداد ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده از سطح باغ‌های مرکبات موجود در غرب مازندران و شرق گیلان ۲۷ جدایه که دارای پرگنه گنبدی شکل به رنگ سفید مایل به کرم تا شیرینی روی محیط NA، توانایی تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB، گرم منفی، اکسیداز منفی، لوآن مثبت، آرژنین د هیدرولاز منفی، عدم توانایی لپانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت

تمامی ۲۷ جدایه مورد بررسی به همراه ۳ جدایه دریافتی از اسپانیا (IVIA) به عنوان جدایه‌های *P. s. pv. syringae* شناسایی شدند (۲۲ و ۲۵). نتایج به دست آمده نشان داد که واکنش تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در آزمون‌های فنوتیپی عمدتاً مشابه یکدیگر بودند. مطالعات محققین قبلی نیز حاکی از تشابه زیاد بین جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ خصوصیات فنوتیپی در یک گروه میزبانی می‌باشد (۱) و (۲).

جدایه‌ها قادر به استفاده از منابع کربنی گلوکز، گزیلوز، سوربیتول، گالاکتوز، ساکاروز، مانیتول بودند ولی هیچ یک از جدایه‌ها نتوانستند از مالتوز و رامنوز استفاده کنند و در استفاده از قند لاکتوز متغیر بودند (جدول ۳). نشانه‌های بیماری بعد از دو تا پنج روز پس از مایه‌زنی، روی برگ‌ها به صورت لکه‌های آب‌سوخته مشاهده شد که این لکه‌ها به تدریج نکروزه شدند و در گیاهان شاهد نشانه‌ای ظاهر نگردید (شکل ۱). تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری بودند و از نظر بیماری‌زایی تفاوتی نشان ندادند. بر اساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی



شکل ۱- نتایج آزمون فوق حساسیت روی برگ توتون (سمت چپ)، نتایج آزمون بیماری‌زایی روی برگ کامکوات (سمت راست)  
Figure 1- The results of hypersensitivity test on leaf tobacco (left), The results of pathogenicity test on kumquat trees (right)

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas syringae pv. syringae* به کار برده شده در بررسی

Table 2- List of *Pseudomonas syringae pv. syringae* isolates used in this study

کد جدایه Strain	محل جمع‌آوری Origine	میزبان Host
C2-C4	چابجان Chayjan	پرتقال تامسون - نارنگی پیچ - نارنج Orange - Page - Sour Orange
A1-A3	عباس‌آباد Abbasabad	کامکوات - پرتقال تامسون - نارنج Kumquat-Orange-Sour Orange
H2-H4	هریس Heris	کامکوات - نارنگی پیچ Kumquat-Page
K1-K2-K5	کلارآباد Kelarabad	نارنج - پرتقال تامسون - نارنگی پیچ Sour orange-Orange - page
R1-R2-R4-R5	رامسر (مؤسسه گیاهپزشکی) Ramsar	کامکوات - نارنگی پیچ - پرتقال تامسون Kumquat-Page-Orange
Ch1-Ch4	چابکسر Chaboksar	پرتقال تامسون - نارنج Orange-Sour orange
t1- t2	تازه‌آباد Tazehabad	کامکوات - پرتقال تامسون - نارنج Kumquat-Orange-Orange Sour
K11-k12-K15	کلاچای Kelachay	نارنج - پرتقال تامسون - نارنگی پیچ Sour orange-Orange-Page
T1-T3-T5-T6	تنکابن Tonekabon	کامکوات - نارنگی پیچ - نارنج - پرتقال تامسون Kumquat-page-Sour Orange-Orange
Ka3-Ka4	کتالم Ketalem	کامکوات - پرتقال تامسون Kumquar-Orange
E1-E2-E3	اسپانیا Spain	نارنگی پیچ - پرتقال تامسون - نارنج Page-Orange-Sour orange

پرتقال (*C. sinensis*)، نارنگی پیچ (*C. reticulata*)، نارنج (*C. aurantium*)، کامکوات (*Fortunella margarita*)

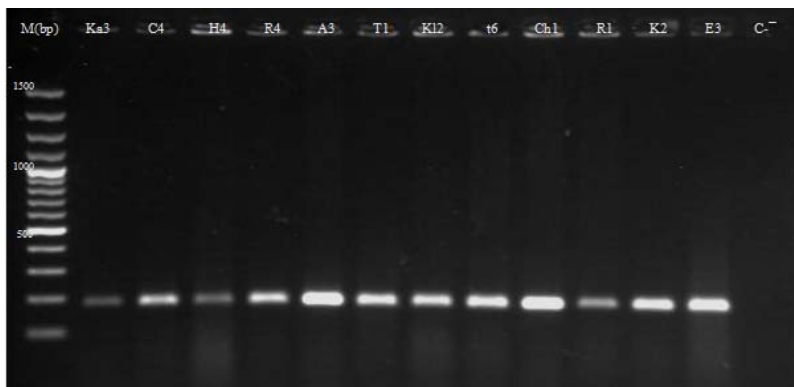
جدول ۳- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonase syringae* pv. *syringae*  
 Table 3- Phenotypic characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates

خصوصیات Characteristic	واکنش Reaction	واکنش جدایه‌های مرجع Reference reaction isolates
واکنش گرم Gram reaction	-	-
تولید رنگدانه فلورسانت Flourecent pigmentation	+	+
رشد هوازی / بی هوازی Oxidative/Fermentative	هوازی Oxidative	هوازی Oxidative
اکسیداز Oxidase	-	-
واکنش فوق حساسیت Hypersensitive reaction	+	+
لپهانیدن ورقه‌های سیب زمینی Potato rot	-	-
آرژنین د هیدرولاز Arginine dihydrolase	-	-
تولید لوآن Levan formation	+	+
کاتالاز Catalase	+	+
اوره آز Urease	+	+
تولید سیرینگومایسین Syringomycin production	+	+
احیاء نیترات Nitrate reduction	-	-
هیدولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis	+	+
هیدولیز لیپید Lipid hydrolysis	+	+
هیدولیز نشاسته Starch hydrolysis	-	-
هیدولیز اسکولین Aesculin hydrolysis	+	+
هیدولیز کازئین Casein hydrolysis	+	+
هیدولیز توئین ۸۰ Tween 80 hydrolysis	±	±
رشد روی نمک طعام ۵٪ Growth on 4% NaCl	+	+
رشد روی نمک طعام ۶٪ Growth on 6% NaCl	-	-
استفاده از منابع کربنی Utilization of carbon source		
مانیتول Mannitol	+	+
سوربیتول Sorbitol	+	+
ساکروز Sucrose	+	+
گالاکتوز Galactose	+	+
رامنوز Ramnose	-	-
کزیلوز Xylose	+	+
لاکتوز Lactose	±	±
گلوکز Glucose	+	+
مالتوز Maltose	-	-
دی آرابینوز D- Arabinose	+	+
ال هیستیدین L-Histidin	+	+
ال آلانین L- Alanine	+	+
ال لوسین L-Leucine	+	+
گلیکوژن Glycogen	-	-
ال فنیل آلانین L-Phenylalanine	-	-
ال اورنیتین L-Ornithine	+	+

## واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل

با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی باکتری مربوط به ژن اختصاصی تولید زهرابه سیرینگومايسن B، پس از انجام PCR و تفکیک محصول روی ژل آگارز ۱/۵٪، در تمامی جدایه‌های بیماری‌زا، قطعه ۱۹۸ جفت بازی از ژن *syRB* تکثیر شد (شکل ۲). تکثیر قطعه ۱۹۸ جفت بازی از ژن *syRB* نیز تأیید کننده نتایج آزمون‌های

بیوشیمیایی و بیماری‌زایی در شناسایی جنس و گونه باکتری‌های بیمارگر به‌عنوان *P. s. pv. syringae* بود. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر ژن *syRB* که کد کننده زیر واحد کوچک این زهرابه است به عنوان روش سریع و مفید در ردیابی این جدایه معرفی گردیده است (۲۷). نتایج فوق با نتایج حاصل از تحقیقات گل‌محمدی (۷) در غرب استان مازندران و شرق گیلان و حسن زاده (۱۰) در غرب مازندران مطابقت دارد.



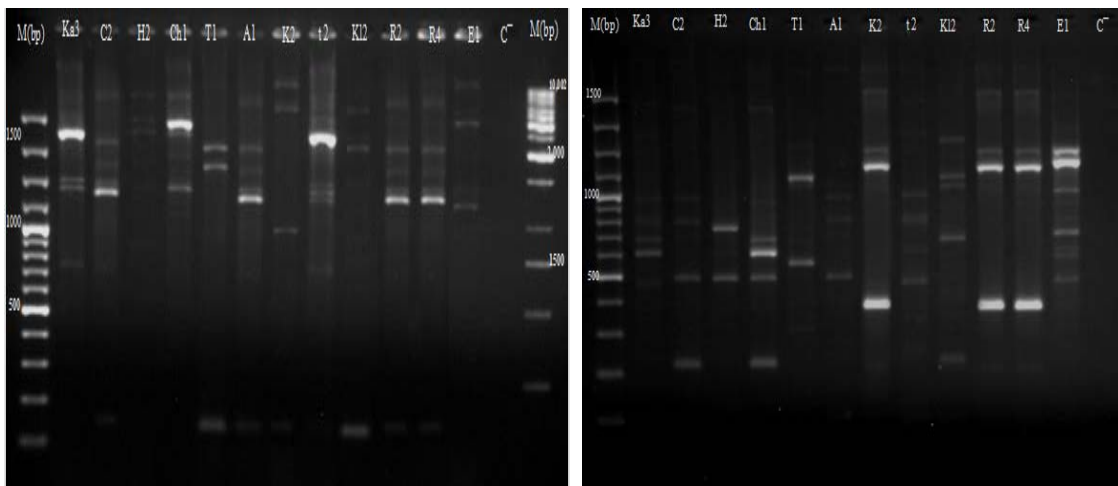
شکل ۲- الکتروفورز ژل آگاروز ۱.۵ درصد محصولات PCR سویه‌های مختلف *Pss* با آغازگرهای اختصاصی SYRBF و SYRBR: از چپ به راست: M (100bp DNA Ladder)، Ka3، C4، H4، R4، A3، T1، K12، t6، Ch1، R1، K2، E3 (کنترل مثبت)، C<sup>-</sup> (کنترل منفی)

Figure 2- 1.5% Agarose gel electrophoresis of PCR-products of *Pss* strains with Specific primers SYRBF and SYRBR. Left to Right: M (100bp DNA Ladder), Ka3, C4, H4, R4, A3, T1, K12, t6, Ch1, R1, K2, E3 (positive control), C<sup>-</sup> (Negative control)

شدند که گروه اول شامل ۴ جدایه از کتالم، کلارآباد و چابکسر بود و سایر جدایه‌ها به‌همراه ۳ جدایه دریافتی از اسپانیا (IVIA) در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۴).

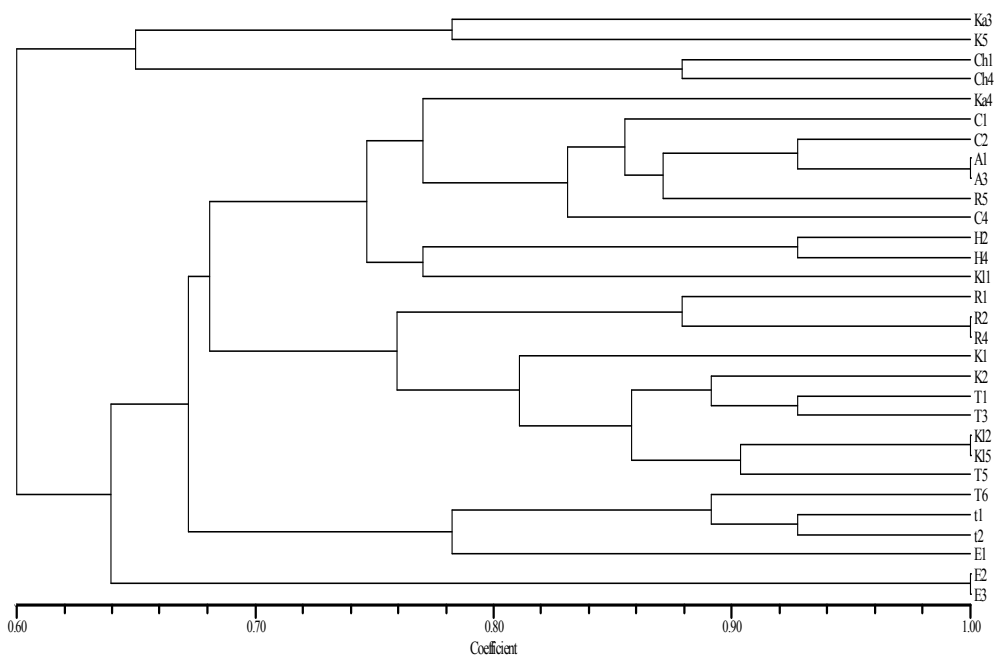
تنوع در اثر انگشت ژنتیکی حاصل از REP-PCR و ERIC کاملاً مشهود بود. وجود تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های مختلف *Pss* درختان میوه هسته‌دار با جدایه‌های به‌دست آمده از سایر میزبان‌ها در بررسی‌های قبلی گزارش شده است (۱، ۲۰ و ۲۱). در بررسی‌های نجفی‌پور و تقوی (۲۱) روی ۵۸ جدایه *Pss* به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف از جمله درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار، گیاهان زینتی، چند گونه از غلات و گونه‌های دولپه‌ای، مشخص گردید که جدایه‌های *Pss* بر اساس انگشت‌نگاری ژنتیکی با Box-PCR در سه گروه مختلف قرار می‌گیرند، گروه یک آن که شامل اکثر جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار بود، علی‌رغم قرار گرفتن در یک گروه تفاوت‌هایی را داشته و کاملاً یکسان نبودند و در دندروگرام ترسیمی تنوع بین جدایه‌های هر گروه نیز وجود داشت.

در این بررسی پس از انجام PCR با روش‌های REP-PCR و ERIC نقوش الکتروفورزی DNA جدایه‌ها به‌دست آمد (شکل ۳). آنالیز خوشه‌ای داده‌های به‌دست آمده، به روش UPGMA و ضریب تشابه سیمپل مچینگ انجام شد. استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر متداول‌تر است زیرا خصوصیات همه اعضای مربوط به خوشه‌ها را پوشش می‌دهد (۲۴). بر اساس دندروگرام رسم شده برای نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC1R/ERIC2 جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۵ درصد به ۶ و با استفاده از آغازگر REP1R/ REP2 به ۵ گروه تقسیم شدند. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل از هر دو روش مذکور به‌صورت ترکیبی انجام شد و دندروگرام به‌دست آمده از ترکیب داده‌های حاصل از REP-PCR و ERIC ترسیم گردید و ضریب کوفتیتیک آن ۰/۸۵ محاسبه شد. نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از چهار آغازگر ERIC1R، ERIC2، REP1R، REP2 به‌صورت مرکب نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه با ۷۵ درصد تشابه در ۶ گروه قرار می‌گیرند و در سطح تشابه ۶۲ درصد به دو گروه تقسیم



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با آغازگرهای ERIC1R/ERIC2 (راست) و REP1R/REP2 (چپ) در ژل آگارز ۱/۵ درصد از چپ به راست: M (100bp DNA Ladder)، E1 (کنترل مثبت)، C<sup>-</sup> (کنترل منفی)، M (1kb DNA Ladder)

Figure 3- Electrophoretic profiles of rep-PCR product with primers ERIC1R/ERIC2 (right) and REP1R/REP2 (left) in 1.5% agarose gel Left to Right: M (100bp DNA Ladder), ka3, C2, H2, Ch1, T1, A1, K2, t2, KI2, R2, R4, E1 (Positive control), C<sup>-</sup> (Negative control), M (1kb DNA Ladder)



شکل ۴- دندروگرام تلفیق نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR باکتری *Pseudomonase syringae* pv. *Syringae* با آغازگرهای REP1R/REP2 و ERIC1R/ERIC2

Figure 4- Dendrogram integrated Electrophoretic profiles of rep-PCR product of *P. syringae* pv. *Syringae* with primers ERIC1R/ERIC2 and REP1R/REP2

استان شمالی ایران با استفاده از آغازگرهای REP و ERIC و با ترکیب آغازگرها پرداخت که نتایج نشانگر وجود تنوع ژنتیکی درون

عباسی و همکاران (۱) به ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. s. syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در چند

وجود تفاوت معنی‌دار در بین جدایه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های منتخب *P. s. pv. syringae* با توجه به یکسان بودن گروه میزبانی از لحاظ خصوصیات ژنوتیپی بر اساس rep-PCR تنوع بسیار بالایی دارند و همگن نمی‌باشند و این بیانگر وجود ژنتیکی بالا درون جدایه‌های *Pss* عامل بیماری بلاست در مرکبات در شمال کشور می‌باشد. نشانگر ERIC و REP به‌طور مؤثری قادر است تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های متعلق به جمعیت‌های مورد مطالعه را به‌خوبی نشان دهد در حالی که همه آن‌ها از یک گروه میزبانی جدا شده و از قدرت بیماری‌زایی مشابهی برخوردارند. با توجه به اینکه روش rep-PCR توانست تنوع جدایه‌های مختلف *Pss* را منعکس کند این روش به‌عنوان یک روش مولکولی سریع و مفید می‌تواند جدایه‌های مختلف پاتووار *Pss* حتی جدایه‌هایی را که ارتباط ژنتیکی نزدیکی با هم دارند، از یکدیگر متمایز نماید (۱، ۱۶ و ۲۰). نتایج به‌دست آمده از ارزیابی تنوع می‌تواند در استراتژی مدیریت بیماری و مطالعات اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی قابل استفاده باشد (۱۹).

جدایه‌های *Pss* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار بود. سرویلری و همکاران (۶) دریافتند که سویه‌های جدا شده از غلات، مرکبات، حبوبات و گندم اگر چه گروه مهمی از *Pss* های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند، ولی در سطح زیر گونه ناهمگون بوده و در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای در ۷ گروه ژنتیکی قرار می‌گیرند. آغازگر REP در آزمون rep-PCR همانند آغازگر ERIC قادر است تفاوت ژنتیکی را بین پاتووارها به‌خوبی مشخص نماید که این نتیجه با نتایجی که توسط لووئس و همکاران (۱۸) به‌دست آمده، مطابقت دارد. از آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از آغازگرها استفاده شد. رادمارکر و همکاران (۲۳) نیز پیشنهاد کردند که برای یک خوشه‌بندی با ثبات، بهتر است داده‌ها با هم ترکیب شوند. نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه، دارای خصوصیات فنوتیپی مشابهی بودند لذا این خصوصیات نتوانست تنوع جدایه‌ها را به‌خوبی نشان دهد قبلاً نیز چنین نتیجه‌ای به‌دست آمده است (۱۲). با توجه به نقوش حاصل از واکنش rep-PCR و تنوع بالای جدایه‌ها (تشابه در سطح ۷۵٪) و

## منابع

- 1- Abbasi V., Rahimian H., Tajick-Ghanbari M.A., and Rezaian V. 2011. The assessment of genetic diversity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker in stone fruit in some northern province of IRAN. Iranian Journal of Plant Pathology, 47: 133-135. (in Persian with English abstract)
- 2- Aldaghi M., Rahimian H., and Mohamadi M. 2010. Comparison of phenotypic, serological and molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of bacterial canker of stone fruits and blight of cereals. Iranian Journal of Plant Pathology, 45(4): 91-93. (in Persian with English abstract)
- 3- Beigi F., Rahimian H., Goltapeh-mohammadi E., Shams-Bakhsh M., Barzegar A., Busquets A., Garcia-Valdes E., and Lalvat G. 2012. Phenotypic and Pathogenicity Characteristics of the Agents Causing Citrus Blast Disease in the Northern Provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Protection, 43(2):211-222. (in Persian)
- 4- Bradbury J.F. 1986. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. p.175-177. In: Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
- 5- Cheng G.Y., Legard D.E., Hanter J.E., and Barr T.J. 1989. Modified bean pod assay to detect strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that cause bacterial brown spot snap bean. Plant Disease, 73: 419-423.
- 6- Cirvilleri G., Bonaccorsi A., Scuderi G., and Scortichini M. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. Phytopathology, 153: 633-750.
- 7- Golmohammadi M. 2004. Study the distribution and identification of blast disease of citrus in the West of Mazandaran and Gilan East. Citrus Research Institute of the country. The final report of the research project.
- 8- Gross D.C., Cody Y.S., Proebsting E.L., Radamaker J.W., and Spots R.A. 1984. Ecotypes and pathogenicity of Ice- nucleation active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. Phytopathology, 74: 241-284.
- 9- Gross D.C. 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Annual Review of Phytopathology, 29:247-278.
- 10- Hassanzadeh N. 1995. Incidence and progress of different diseases incited by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Journal of Agricultural Sciences Islamic Azad University, 1:5-14.
- 11- Hildebrand D.C., Schroth M.N., and Huisman O.C. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basis for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. Annual Review of Phytopathology, 20: 235-256.
- 12- Hirano S.S., and Upper C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* pathogen, ice nucleus and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 624-653.
- 13- Jones J.B., Chase A.R., and Harris G.K. 1993. Evaluation of the Biolog GN Microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. Plant Disease, 77:553-558.
- 14- Klement Z., Farkas G.L., and Lovrekovich L. 1974. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. Phytopathology, 64: 474-477.
- 15- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, London, 178-703.



- 16- Lilley A.K., Bailey M.J., and Fry J.C. 1996. Diversity of mercury resistance plasmid obtained by exogenous isolation from the bacteria of sugar beet in three successive seasons. *FEMS Microbiology Ecology*, 20: 211-227.
- 17- Little E.L., Bostock R.M., and Kirkpatrick B.C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3818-3823.
- 18- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., and De Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 2286-2292.
- 19- Louws F.J., Rademaker J.W., and Bruijn F.J. 1999. The three Ds of PCR-Base genomic analysis of phyto-bacterial diversity, detection and diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 37: 81-125.
- 20- Mosivand M., Rahimian H., and Shams-Bakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruits and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45: 75-85. (in Persian with English abstract)
- 21- Najafi Pour G., and Taghavi S.M. 2011. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 431-442.
- 22- Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R., and Doudoroff M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23:333-339.
- 23- Rademaker J.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterine L., Vauterine P., and De Bruijn F.J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665-677.
- 24- Rohlf F.J. 2000. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exete software. Applied Biostatistics INC., NY, USA. 493-505.
- 25- Schadd N.W., Jones J.B., and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>rd</sup>ed. American Phytopathology Society Press.
- 26- Shams-Bakhsh M., and Rahimian H. 1990. Identification agents of Citrus Blast in Mazandaran. p. 150. In Proceedings of the 9<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress. 1990. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
- 27- Sorensen K.N., Kim K.H., and Takemoto J.Y. 1998. PCR Detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 226-230.
- 28- Versalovic J., Koeuth T., and Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application fingerprinting bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19: 6823-6831.
- 29- Versalovic J., Scheider M., De Bruijn F.J., and Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40.
- 30- Weingart H., and Volksch B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP and IS50-PCR. *Phytopathology*, 87: 339-345.
- 31- Whiteside L.O., Garnesy S.M., and Timmer L.W. 1989. Campendium of citrus disease. 2<sup>th</sup>ed. American Phytopathology Society Press.
- 32- Yessad S., Manceau C., and Luisetti J. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease*. 76(4):370-373.
- 33- Young J.M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902. *Annual Applied Biology*, 118: 283-298.
- 34- Young J.M., Takikawa Y., Gardan L., and Stead D.E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 67-105.
- 35- Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., and Bender C.L. 2000. Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringe* pv. *maculicola*. *Plant Disease*, 84: 1015- 1020.