Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

# تعیین گونه ها و تنوع استرین های ریزوبیوم عامل بیماری گال طوقه مو با IS50-PCR

کیومرث روح رضی[1]، حشمت اله رحیمیان*[2]

1- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

2- استاد میکروبیولوژی و بیماری های گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: 1390/7/24، تاریخ پذیرش: 1391/5/7

## چکیده

بیماری گال طوقه یکی از مهم ترین بیماری های تاک در اکثر تاکستان های دنیا است ولی خسارت بیماری در مناطقی که آب وهوای سرد دارند شدیدتراست. به منظور بررسی تنوع گونه ها و استرین های ریزوبیوم عامل بیماری، 105 استرین از غده های در حال رشد روی ساقه و طوقه انگور (*Vitis vinifera*)، در استان های آذربایجان شرقی و غربی در سال های 89-1388 جدا گردید. شناسایی گونه و تنوع استرین ها با مقایسه ویژگی های فنوتیپی ، حضور ژن virD2 ، ژن سنتز پلی گالاکتروناز و نیز انگشت نگاری ژنتیکی حاصل از IS50-PCR با یکدیگر و با استرین های مرجع *Rhizobium* ارزیابی گردید. ژن *virD2* استرین ها با استفاده از جفت آغازگر VirD2A/VirD2C تکثیر گردید که 92 استرین با این آغازگر قطعه 224 جفت نوکلوتیدی را تکثیر کردند. به منظور تفکیک دو گونه *R.vitis* و *R.radiobacter* ژن مولد پلی گالاکتروناز استرین ها با استفاده از جفت آغازگرPGF/PGR تکثیر شد. تعداد 77 استرین که با این آغازگر قطعه 466 جفت نوکلوتیدی را تکثیر کردند به عنوان *R.vitis* و بقیه *R.radiobacter* تشخیص داده شدند. در مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیرشده در IS50-PCR ، استرین ها در سطح تشابه 55 درصد در 4 گروه قرار گرفتند، اکثر استرین ها با استرین مرجع *R.vitis* در یک گروه قرار گرفتند، در سطح تشابه 80% استرین های هر دو گروه تشکیل چندین زیر گروه را دادند که نشان دهنده وجود تنوع زیاد درون گونه ای در جمعیت هر دو گونه می باشد.

**واژه های کلیدی:** *گال طوقه، ریزوبیوم، پلی گالاکتروناز، IS50-PCR*

* نویسنده مسئول: حشمت اله رحیمیان تلفن: 01513822563 Email: Rahimian.H@gmail.com



www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

گیاهان دو لپه در بیش از پنجاه خانواده اعم از درختان مثمر و غیرمثمر،گیاهان زراعی، زیتی و تعدادی از گونه های مهم بازدانه به باکتری عامل بیماری گال یا سرطان طوقه آلوده می شوند. شیوع و گسترش این بیماری در سالهای اخیر باعث زوال و مرگ برخی از درختان میوه به خصوص تاک شده و تهدیدی جدی برای این گونه محصولات تلقی می شود (Agrios, 2005; Burr *et al.*, 1998). *R. vitis* گونه غالب عامل گال طوقه تاک بوده ولی در حدود 10درصد از موارد عامل، *R.radiobacter* است (Szegedi & Bottka, 2002; Burr *et al.*, 1998). در پژوهشی Young et al. (2003) بر اساس توالی 16S rRNA آگروباکتریوم های بیماریزا در گیاهان را متعلق به ریزوبیوم دانسته و نام جنس *Agrobacterium* را به جنس *Rhizobium* تغییر نام دادند. هم اکنون هم نام اگروباکتریوم در بین بیماری شناسان گیاهی و بسیاری از محققین دیگر متداول بوده و بکار گرفته می شود.

وقوع سرطان طوقه انگور در ایران نخستین بار توسط امانی در سال 1345 ازقزوین گزارش گردید (Amani, 1966). در پی آن آلودگی در چندین استان کشور مشاهده شد. سرطان طوقه انگور در سال 1372 از استان های فارس و کهگیلویه و بویر احمد گزارش گردید (Ale-Yasin & Banihashemin, 1993). در سال 1377 باکتری عامل بیماری از تاکستان های کرج و تاکستان جدا و تحت گونه *A.vitis* شناسایی گردید (Fatehi *et al.*, 1998). در پژوهشی Irani & Ghasemi (2004) عامل گال طوقه و ریشه تاکستان های استان آذربایجان غربی را *A.vitis* معرفی کردند.

تنوع جمعیت های اگروباکتریوم بدست آمده از گیاهان باغی و زینتی در چند نقطه کشور ارزیابی و استرین ها از نظر فنوتیپی به سه گروه تقسیم بندی شدند، استرین های به دست آمده از تاک بیشترین شباهت فنوتیپی را به *R.radiobacter* داشتند و در آزمون BOX-PCR تنوع وسیعی نشان دادند (Salehi *et al.*, 2006).

براساس نتایج بررسی های انجام شده هنوز به روشنی مشخص نیست که گال طوقه انگور در آذربایجان و برخی از استان های دیگر ناشی از کدام گونه ریزوبیوم بوده وسهم دو گونه *R.vitis* و *R.radiobacter* به عنوان عامل بیماری در تاکستان-ها چقدر بوده و جمعیت ها تا چه حد همسان یا متنوع هستند.

با در نظر گرفتن اهمیت و گستردگی محصولات مختلف، از جمله انگور که از حمله این باکتری خسارت می بینند و با توجه به پیشرفت بیش از بیش عامل بیماری و خسارت قابل توجه ناشی از آن، لازم است جهت تدوین برنامه های مناسب پیشگیری و مدیریت موثرتر بیماری، تنوع عامل آن به طور دقیق شناسایی گردد. پژوهش



www.SID.ir

Archive of SID



حاضر در جهت شناسایی گونه یا گونه های ریزوبیوم مولد گال طوقه و ساقه مو و تنوع احتمالی آن ها در استان های آذربایجان شرقی و غربی بر پایه ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی صورت گرفته است.

**مواد و روش ها**

**نمونه برداری و جداسازی**

در سال‌های 1390-1389 از تاکستان های مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی (شهرستان-های مراغه، جلفا، اهر، مرند، سراب، تبریز، اسکو، آذرشهر، بناب، میانه و عجب شیر) و برخی مناطق استان آذربایجان غربی (شهرستان های میاندوآب و سلماس) بازدید و نمونه هایی از ساقه و طوقه تاک‌های دارای گال سفید و به ظاهر در حال رشد برداشته شد. نمونه های تاک در پاکت های کاغذی قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه-های گال داخل پتری های استریل حاوی چند قطره آب مقطر استریل به قطعات کوچکتر خرد شده و پس از 30 دقیقه نگهداری در شرایط استریل، یک قطره از سوسپانسیون حاصل روی محیط PDA+CaCO3 (Potato dextrose agar + %5 CaCO3) مخطط شده و تشک ها در دمای 28-25 درجه سلیوس نگهداری شدند (Schadd *et al.*, 2001). پس از گذشت 3-2 روز پرگنه های شبیه به *Agrobacterium* (پرگنه های سفید رنگ، محدب با حاشیه صاف) انتخاب گردید. هر استرین به طور جداگانه روی محیط کشت های انتخابی ری ساسر (RS) و دی وان ام (D1M) مخطط گردیدند (Schaad *et al.*, 2001; Roy & Sasser, 1983).

**آزمون بیماریزایی**

جدایه ها روی محیط نوترینت آگار حاوی سوکروز (NAS) در دمای 28 درجه سلسیوس کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت، با سوزن استریل مقداری از کلنی باکتری‌ها برداشته شده و با ایجاد زخم بر روی ساقه جوان گوجه فرنگی (*Lycopersicom esculentum* Mill.)، آفتابگردان (*Helianthus annus* L.) و توتون (*Nicotiana tabacum* L.) مایه زنی گردیدند. گیاهان مایه زنی شده به مدت 4-3 هفته در گلخانه با دمای 28-22 درجه سلسیوس نگهداری شدند (Bouzar *et al.*, 1995; Burr & Katz, 1983).

در نمونه شاهد، قسمتی از ساقه گیاهان مورد آزمایش با سنجاق استریل زخمی شده و بدون مایه زنی در شرایط مشابه نگهداری شد.

**آزمونهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه ای برای شناسایی استرین ها**

آزمون های بیوشیمیائی و فیزیولوژیک طبق روش های استاندارد باکتری شناسی (Schaad *et al.*, 2001; Bouzar *et al.*, 1995) انجام شد. استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط پایه آیر و



www.SID.ir

Archive of SID



به روش شاد انجام شد، قندها، اسید های آلی و اسیدهای آمینه با روش تندال[1] و برخی با عبور از فیلتر 0/22 میکرومتری سترون و به غلظت نهائی 0/5 تا یک درصد به محیط پایه اضافه شد. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منابع کربنی بر اساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسیدیته محیط کشت نسبت به شاهد (محیط آبر فاقد منبع کربنی) تا چهار هفته پس از کشت و نگهداری تشتک ها در دمای 28-25°C، ارزیابی گردید.

**جداسازی DNA ژنومی**

جداسازی DNA از سلول های باکتریایی به روش لایز قلیایی انجام شد (Arabi *et al.*, 2002). دو روز پس رشد استرین های باکتری در محیط NA در دمای 28°C– 25، در آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند. کدری سوسپانسیون ها در 600 نانومتر به 0/2واحد تنظیم و به آنها 0/1 حجم هیدروکسید پتاسیم 10درصد اضافه شد. نمونه ها به مدت دو تا سه دقیقه در آب جوش قرار داده شدند، شفاف شدن سوسپانسیون به عنوان لایزشدن سلول های باکتریایی تلقی گردید، نمونه ها به‌مدت 5 دقیقه با سرعت 12هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس لایه رویی از لوله ها برداشته شده و در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شد. از این نمونه ها به عنوان DNA الگو در واکنش های زنجیره ای پلی مراز استفاده شد.

**تکثیر ژن *virD2* استرین ها**

واکنش ها به حجم 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر بافر 10X PCR، 2/5 میلی مولار $MgCl_2$، 0/2 میلی مولار از مخلوط dNTP، 1/5 میکرولیتر DNA الگو، 1/5 واحد آنزیم تک پلیمراز (شرکت سینا ژن) و 10پیکو مول از جفت آغازگر VirD2A و VirD2C (5′- TCG TCT GGC CCC GAT CGA GCT CAA GT -3′) (5′- ATG TGA CTT TCG TCA TAA -3′) (Hass *et al.*, 1995) (ساخته شده توسط شرکت Bionner کره جنوبی) انجام شد. از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems 2720(USA) برای تکثیر DNA استفاده شد.

برنامه زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه 94°C به مدت سه دقیقه، 35 چرخه شامل واسرشت سازی 94°C به مدت یک دقیقه اتصال آغازگر به DNA، 50°C به مدت 1 دقیقه و گسترش در دمای 72°C به مدت 1 دقیقه و در آخر گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه به کار برده شد (Hass *et al.* 1995).

**تکثیر ژن کدکننده آنزیم پلی گالاکتروناز**

واکنش ها به حجم 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر بافر 10X PCR، 2/5 میلی مولار MgCl2، 0/2 میلی مولار از مخلوط dNTP، 1/5 میکرولیتر DNA الگو، 1/5 واحد آنزیم تک پلیمراز (شرکت سیناژن) و 10پیکو مول از جفت

[1] Tyndall



www.SID.ir

Archive of SID



آغازگر PGF(5′- GGG GCA GGA TGC GTT -3′) PGR (5′- GAC GGC ACT TTT GAG -3′) Szegedi & ) GGG GCT AAG GAT -3′) (Bottka, 2002) (ساخته شده توسط شرکت Bionner کره جنوبی) انجام شد. برنامه زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه 94°C به مدت سه دقیقه، 35 چرخه شامل واسرشت سازی 94°C به مدت یک دقیقه اتصال آغازگر به DNA، 54 °C به مدت 50 ثانیه و گسترش در دمای 72°C به مدت 1 دقیقه و در آخر گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه به کار برده شد ( Bini *et al.*, 2008).

**انگشت نگاری DNA ژنومی با IS50-PCR**

انگشت نگاری DNA ژنومی با روش IS50-PCR (insertion sequence) با استفاده از آغازگر IS50 (5'CAGGACGCTACTTGTGT-3') طبق روش‌های توصیه شده و با کمی تغییر انجام گردید (Weingart & Volksch, 1997). واکنش ها به حجم 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر PCR buffer 10X، 2/5 میلی مولار MgCl2، 0/2 میلی مولار از مخلوط dNTP، 1/5 میکرولیتر DNA الگو و 1/5 واحد آنزیم تک پلیمراز (شرکت سیناژن) و 10 پیکومول از آغازگر انجام شد. تکثیر با برنامه دمایی 4 دقیقه در 94°C، سپس 35 چرخه 94°C به مدت 1 دقیقه، دمای اتصال 38°C به مدت 1 دقیقه و دمای گسترش 72°C به مدت 3 دقیقه انجام شد، طویل شدن نهایی رشته‌های DNA به مدت 10دقیقه در 72°C صورت گرفت. هشت میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر محلول حاوی 0/15 درصد برم فنل بلو و 50 درصد گلیسرول در بافر تریس برات ( TBE، 89/ مولار تریس، 0/89 مولار اسید بوریک، 0/002 مولار EDTA، 8/2 ~ pH) مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز 1/5% ریخته شده و با بکاربردن همین بافر به عنوان بافر محفظه در اختلاف پتانسیل 90 ولت الکتروفورز گردید. برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر 1Kb و 100bp (ساخت شرکت Fermentas) استفاده گردید. ژل با اتیدیوم بروماید (محلول 0/5 میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی و از آن عکسبرداری شد (Ausubel *et al.*, 1992).

**تجزیه وتحلیل داده ها**

گروه بندی جدایه ها با مقایسه نقوش قطعات DNA در ژل و نمره دهی بر پایه وجود یا عدم وجود قطعات همسان و تعیین ضریب تشابه جاکارد[1] صورت گرفت. دندوگرام با روش مقایسه جفت ها از طریق میانگین های بی وزن[2] (UPGMA) و با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02 ترسیم گردید.

[1] Jaccard
[2] Unweighted pair group method with arithmetic mean



www.SID.ir

Archive of SID



## نتایج

### جداسازی

از کشت گال های طوقه و ساقه تاک های نمونه برداری شده از مناطق مختلف آذربایجان، 105 استرین با پرگنه های سفید رنگ، محدب و با حاشیه صاف که پس از سه روز از زمان کشت به قطر دو تا سه میلیمتر روی محیط PDA (سیب زمینی -دکستروز -آگار) رسیده بودند به دست آمد. نام استرین ها و مناطق جداسازی آن ها در جدول 1 نوشته شده است. هر استرین به طور جداگانه روی محیط دی وان ام مخطط گردید و استرین های شبه اگروباکتریوم (با کلونی های محدب و متالیک) انتخاب گردید. از بین 105 استرین ها 77 استرین پس از 4 روز از زمان کشت مخطط آنها روی محیط ری سلسر پرگنه های سفید با مرکز قرمز رنگی، که یکی از مشخصه های *R.vitis* است، را تولید کردند.

### بیماریزایی

از بین 105 استرین بدست آمده، 99 استرین (به جزء استرین های E1 تا E4، D1 و D2) قادر به ایجاد گال در گیاهان گوجه فرنگی، آفتابگردان و توتون پس از 4-3 هفته بودند.

### تعیین ویژگی های فنوتیپی

همه جدایه ها گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، متحرک و هوازی بوده و در آزمون‌های قلیایی کردن شیر لیتموس، تحمل نمک 2%، هیدرولیز اسکولین و توئین 80 مثبت، ولی در آزمونهای هیدرولیز نشاسته و ژلاتین و تولید اندول منفی بودند. جدایه ها براساس خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول که شامل اکثر جدایه-ها بود با جدایه مرجع ICMP (Intern. Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zeeland) 10752 *R.vitis* در یک گروه قرار گرفتند. گروه دوم که از مناطق اهر، مرند، میاندوآب، سلماس و مراغه به دست آمده بود با جدایه مرجع ICMP 5856 *R.radiobacter* در یک گروه قرار گرفتند (خصوصیات فنوتیپی استرین ها در جدول 2 نوشته شده است). بررسی خصوصیات فنوتیپی استرین های بدست آمده از تاکستان های آذربایجان حاکی از دخالت دو گونه *R.vitis* و *R.radiobacter* در ایجاد گال طوقه و شاخه های انگور در این استان ها است. بر این اساس تنوع درون گونه ای استرین های گروه یک که با استرین مرجع *R.vitis* همگروه شدند بیشتر از گروه دو بود.

### تکثیر ژن *virD2* استرین ها

همه استرین ها به جز استرین های G1 تا G7، E1 تا E4، D1 و D2 و استرین مرجع ICMP 5785 *R.radiobacter* قادر به تکثیر قطعه 224 جفت نوکلوتیدی از ژن *virD2* بودند که حاکی از وجود پلازمید Ti در استرین هایی است که قادر به تکثیر قطعه مورد نظر بودند (شکل 1).



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول1- نام محل و سال جداسازی هریک از استرین های *Rhizobium* به دست آمده از تاکستان های استان های آذربایجان شرقی و غربی.**

**Table 1- Source and year of isolation of *Rhizobium* strains obtained from East and West Azarabayjan vineyards.**

| نام استرین ها<br>Isolates | محل جمع آوری<br>Source | سال جداسازی<br>Year of isolation |
|---|---|---|
| F1 تا F5 | آذربایجان شرقی - جلفا(East Azarbayjan-Jolfa) | 2009 |
| AH1 تا AH7 | آذربایجان شرقی - اهر(East Azarbayjan –Ahar) | 2009 |
| N1 تا N7 | آذربایجان غربی - میاندوآب(West Azarbayjan-Miandoab) | 2010 |
| MR1، MR2 ،MR3 | آذربایجان شرقی - مرند(East Azarbayjan –Marand) | 2009 |
| R1 تا R7 ، SA1 تا SA6 | آذربایجان شرقی - سراب(East Azarbayjan –Sarab) | 2009 |
| Ta1 تا Ta4 | آذربایجان شرقی - تبریز(East Azarbayjan –Tabriz) | 2009 |
| D2، D1، S1 تا S6 | آذربایجان شرقی - اسکو(East Azarbayjan –Oskou) | 2009 |
| K1 تا K4 | آذربایجان غربی - سلماس(West Azarbayjan –Salmas) | 2010 |
| AZ1 تا AZ10 | آذربایجان شرقی - آذرشهر(East Azarbayjan –Azarshahr) | 2009 |
| Bd1 تا Bd13 | آذربایجان شرقی - بناب(East Azarbayjan –Bonab) | 2009 |
| G1 تا G7، Marq1 تا Marq9 | آذربایجان شرقی - مراغه(East Azarbayjan –Maragheh) | 2009 |
| E1 تا E4، H1 تا H7 | آذربایجان شرقی - میانه(East Azarbayjan –Mianeh) | 2009 |
| AJ1 تا AJ4 | آذربایجان شرقی - عجب شیر(East Azarbayjan –Ajabshir) | 2009 |



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول2- خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیائی و تغذیه ای استرین های بدست آمده از تاکستان های آذربایجان.**

**Table 2-Morphological, biochemical and physiological characteristics of the bacterial strains isolated from vineyards of Azarbayjan.**

| ازمون (Test) | واکنش استرین ها (Reaction) | |
|---|---|---|
| | گروه 1(78 استرین) (Group 1, 78 strains) | گروه 2 (29 استرین) (group 2, 29 strains) |
| رشد روی محیط D1M (Growth on D1M medium) | + | + |
| رشد روی محیط ری ساسر(Growth on RS medium) | + | - |
| رشد روی محیط 1A(Growth on 1A medium) | - | 57[a] |
| کاتالاز (Catalase) | + | + |
| اکسیداز ( Oxidase) | 78[a] | + |
| تحمل نمک 2% (Growth on 3% NaCl) | + | + |
| شیر لیتموس (Litmus milk) | قلیایی | قلیایی |
| هیدرولیز اسکولین(Hydrolysis of esculin) | + | + |
| هیدرولیز توئین80 (Hydrolysis of tween 80) | + | + |
| هیدرولیز نشاسته (Hydrolysis of starch) | - | - |
| هیدرولیز ژلاتین (Hydrolysis of gelatin) | - | - |
| تولید $H_2S$ ازسیستئین( Production of H2S from cystein) | 54[a] | 23[a] |
| رشد هوازی/ بی هوازی (Oxidative/Fermentative) | O | O |
| متیل رد (MR) ، دناز (DNase) | - | - |
| تولید مواد احیا کننده از سوکروز(RSS) | - | - |
| احیاء نیترات (Nitrate reduction ) | 42[a] | 37[a] |
| فسفاتاز(Phosphatase activity) | - | - |
| تولید رنگ فلورسنت ( Production fluorescent pigment) | - | - |
| اوره آز (Urease) | + | + |
| تولید لوان (Levan formation) | + | + |
| تولید کتولاکتوز(Formation of ketolactose) | - | + |
| تولید پلیکل از فریک آمونیوم سیترات( Formation of pellicle in ferric ammonium citrate medium) | - | + |
| تحرک در PH=7 (Motility at PH=7) | - | + |
| رشد در دمای 35 درجه سلسیوس(Growth at 35 $^0$C) | + | + |
| تولید اندول (Production of indole) | - | - |
| تولید اسید از (Production of acid from) | | |
| آدونیتول ، گلوکز (Glucose,Adonitol) | + | + |



www.SID.ir

Archive of SID



ادامه جدول 2

| | | |
|---|---|---|
| ساکارز ، لاکتوز ، سوربوز (Sucrose,Lactose) | + | + |
| رافینوز (Raffinose) | 80[a] | + |
| زایلوز ، فروکتوز، ملیبیوز (Xylose,Fructose,Melibiose) | + | + |
| گلیسرول ، سوربیتول ، مانوز (Glycerol,Sorbitol,Mannose) | + | + |
| اریتریتول (Erythritol) | - | - |
| زایلیتول، دولسیتول (Xylitol,Dulcitol) | - | + |
| آرابینوز ، مالتوز، رامنوز (Arabinose,Maltose,Rhamnose) | + | + |
| اینوزیتول (Inositol) | 87[a] | - |
| ملزیتوز (Melezitose) | 52[a] | + |
| استفاده از Utilization of | | |
| والین ، لیزین، ال -آرژنین (Valine,Lysine,Arginine) | - | - |
| سیترات ، مالونات، ال - تارتارات (Citrate,Malonate,L-tartrate) | + | - |
| استات ، دی - تارتارات، پروپیونات (Acetate,D-tartrate) | - | + |
| بتاآلانین ، ال - لوسین (β-alanine, L-leucine) | - | - |
| لاکتات، پیروات (Lactate,Pyruvate) | + | + |
| گلوکانات ، اتانول (Gluconate,Ethanol) | - | + |
| فرمات (Formate) | 37[a] | 21[a] |
| ال -پرولین (L-proline) | 85[a] | + |
| دی آلانین (D-alanine) | - | 28[a] |
| ال -سرین (L-serine) | 75[a] | 55[a] |
| گلوتامات (Glutamate) | + | 78[a] |
| سالسین (Salicin) | 66[a] | + |
| سوکسینات (Succinate) | 75[a] | 47[a] |
| گالاکترونات (Galacturonate) | 84[a] | - |

+ : همه استرین ها پاسخ مثبت دادند -: همه استرین های پاسخ منفی دادند a : درصد استرین هایی که پاسخ مثبت دادند

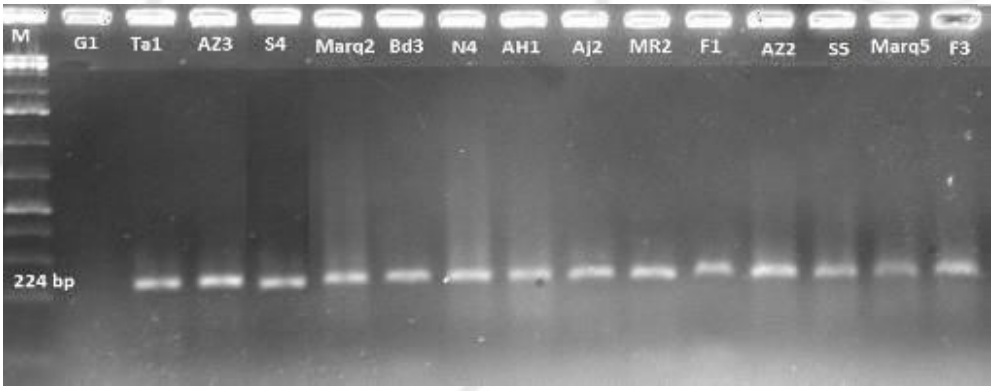
**a = percentage of strains with positive reaction. . - = negative results with all strains. + = positive results with all strains**



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل1- قطعه224 بازی تکثیر شده از ژن *virD2* استرین های آگروباکتریوم عامل گال طوقه مو در ژل اگارز 1/5 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، M: نشانگر جرم مولکولی 100bp.**

**Figure 1- Electrophoresis of the 224bp fragment of the virD2 gene amplified in PCR of representative strains of *Agrobacterium* isolated from galls on grapevine crowns, in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide, M: 100bp DNA ladder.**

**تکثیر ژن کدکننده آنزیم پلی گالاکتروناز**

با توجه به اینکه استرین های *R.vitis* تولید آنزیم پلی گالاکتروناز می کنند، لذا برای تفکیک دو گونه *R.vitis* و *R.radiobacter*، ژن کد کننده آنزیم پلی گالاکتروناز استرین ها با استفاده از آغازگر اختصاصی PGF/PGR تکثیر گردید، تعداد 77 استرین که با این آغازگر قادر به تکثیر باند 466 جفت نوکلوتیدی بودند *R.vitis* شناسایی شده و بقیه *R.radiobacter* تشخیص داده شدند (شکل2).

**انگشت نگاری DNA ژنومی با IS50-PCR**

براساس آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمایی و بیماریزایی و همچنین نتایج بدست آمده از تکثیر ژن های *virD2* و مولد آنزیم پلی گالاکتروناز، 40 استرین از بین استرین ها به عنوان نماینده انتخاب و DNA ژنومی آنها با IS50-PCR تکثیر گردید (شکل3). تعداد باندهای تکثیر شده با این روش 15 تا 25 باند و محدوده اندازه باندها بین 100 تا 3000 جفت نوکلوتید بود. مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیرشده با IS50-PCR نشان داد که استرین ها در سطح تشابه 55 درصد در 4 گروه قرار گرفتند (شکل4) با توجه به دندروگرام حاصله اکثر استرین ها ی عامل گال طوقه مو با استرین مرجع *R.vitis* ICMP 10752 در یک گروه قرار گرفتند و 9 استرین با استرین مرجع *R.radiobacter* ICMP 5856 گروه جداگانه‌ای را تشکیل دادند. استرین های مرجع *R.rubi* ICMP 6428 و *R.rhizogenes* ICMP5794 هریک در شاخه ای که فاصله زیادی با خوشه های دیگر داشت، قرار گرفتند. در سطح تشابه 80% استرین های هر دو گروه تشکیل چندین

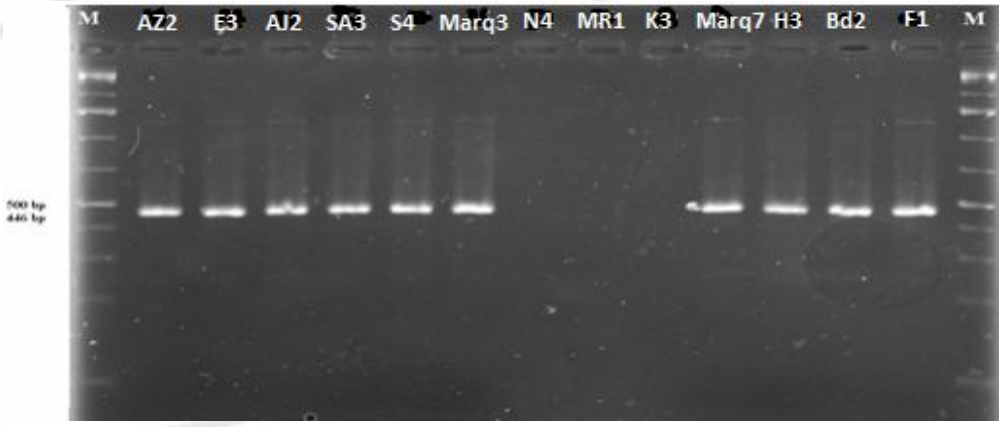


www.SID.ir

Archive of SID



زیر گروه را دادند که نشان دهنده وجود تنوع زیاد درون گونه ای در جمعیت هر دو گونه می باشد.




**شکل2- قطعه 466 بازی تکثیر شده از ژن مولد پلی گالاکتروناز استرین ها در ژل آگارز 1/5 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. استرین های (*Agrobacterium vitis*)*Rhizobium vitis*: F1، Bd2، H3، Marq7، K3، Marq3، S4، SA3، Aj2، E3 و Az2، استرین های (*A.tumefaciens*)*R.radiobacter*: N4، MR1 و K3، M: نشانگر جرم مولکولی 100 bp**

**Figure 2- 466 bp fragment from the polygalacturonase gene in 1.5 % agarose gel stained with etidium bromide. *Rhizobium vitis (Agrobacterium vitis)* isolates (Lanes Az2, Marq7, H3, Bd2, E3, F1, AJ2, SA3, and S4). *R.radiobacter* (*A.tumefaciens*) (LanesN4, MR1, K3), M: 100bp DNA ladder.**

**بحث**

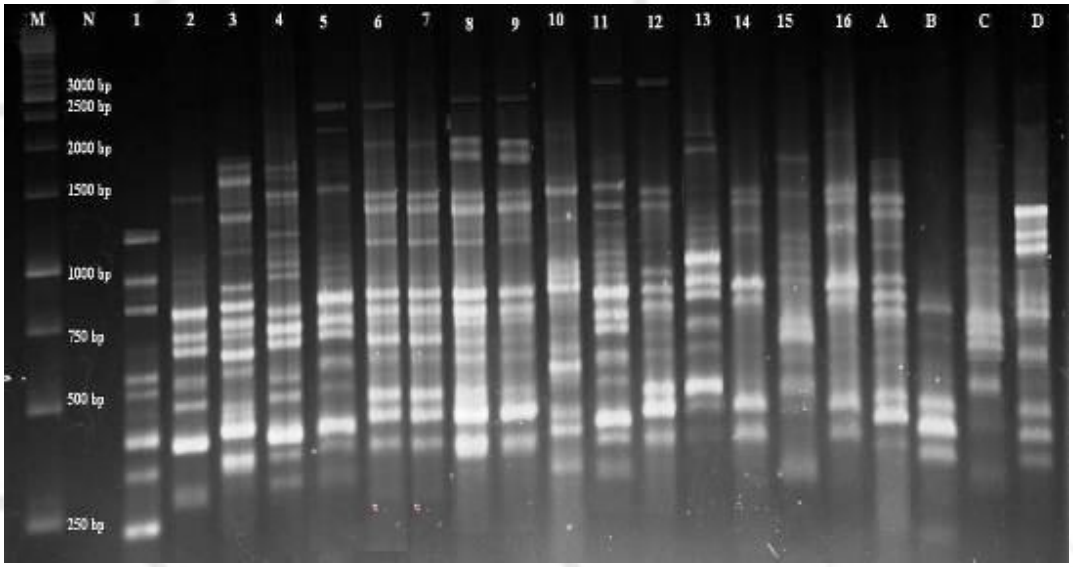
گال طوقه یکی از مهمترین بیماری های تاک در کشور است که بیشتر در مناطق سردسیر و برف گیر بروز می‌نماید (Burr & Katz, 1983,1984)، از این رو تاکستان های استان های آذربایجان شرقی و غربی را می توان جزء مستعدترین مناطق ایران برای وقوع این بیماری به حساب آورد. گال طوقه تاک یکی از اولین بیماری های باکتریایی گزارش شده از ایران به شمار می آید (Amani, 1966) در آن زمان بر اساس معدود آزمایش های فنوتیپی صورت گرفته، از جمله قابلیت مصرف چند منبع کربنی، باکتری عامل بیماری در قزوین *A.tumefaciens*(*R.radiobacter*) شناسایی شد. در برخی از گزارش های بعدی که در زمینه شناسایی بیماری و تعیین باکتری عامل آن صورت گرفته است سهم گونه های مختلف *Rhizobium* (*Agrobacterium*) در ایجاد گال طوقه تاک مشخص نشده است (Shahabi & Taghavi, 2010; Salehi *et al.*, 2004; Javaheri *et al.*, 2000).



www.SID.ir

Archive of SID






**شکل3- نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه های بدست آمده از تاکستان های آذربایجان و استرین های مرجع در آزمون IS50-PCR . 1: استرین Marq1، 2: استرین Bd1، 3 : استرین H2، 4: استرین F1، 5: استرین R2، 6 : استرین Aj3، 7: استرین Bd5، 8: استرین SA1، 9: استرین SA3، 10: استرین R3، 11: استرین Az2، 12: استرین Az4، 13: استرین MR1،14: استرین Marq5، 15: استرین N2، 16: استرین R4، A: استرین *Rhizobium vitis* ICMP10752 ، B: استرین مرجع ICMP5856 *R.radiobacter*، C:استرین ICMP5794 *R.rhizogenes*، D: استرین ICMP6428 *R.rubi*.**

**Figure 3- IS50–PCR fingerprints of *Agrobacterium* strains isolated from vineyards of Azarbayjan and reference strains. Lanes 1:Marq1; 2:Bd1; 3:H2; 4:F1; 5:R2; 6:Aj3; 7:Bd5; 8:SA1; 9:SA3; 10:R3; 11:Az2; 12: Az4; 13:MR1; 14:Marq5; 15:N2; 16:R4; A: *Rhizobium vitis* ICMP10752; B:*R.radiobacter* ICMP 5856; C:*R.rhizogenes* ICMP 5794; D:*R.rubi* ICMP6428; N:(Negative control); M:1Kb DNA ladder.**

در بررسی هایی *R.vitis*(*A.vitis*) به عنوان عامل گال طوقه تاک در استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد و آذربایجان غربی معرفی شده است (Irani & Ghasemi, 2004; Ale-Yasin *et al.*, 1993).

بر اساس نتایج آزمون های فنوتیپی، حساسیت به انتی بیوتیک ها و خصوصیات بیماری زایی گزارش شد که 32 استرین بدست آمده از گال طوقه تاک در دو منطقه کرج و تاکستان ناهمگون هستند به طوری که 68 درصد استرین ها متعلق به گونه *A.vitis*(*R.vitis*) بوده و بقیه استرین‌ها، بیوارهای 1 و 2 *Agrobacterium* (*Rhizobium*) هستند (Fatehi *et al.*, 1998). بدین ترتیب مشخص ساختند که در منطقه ای که بیماری برای اولین بار

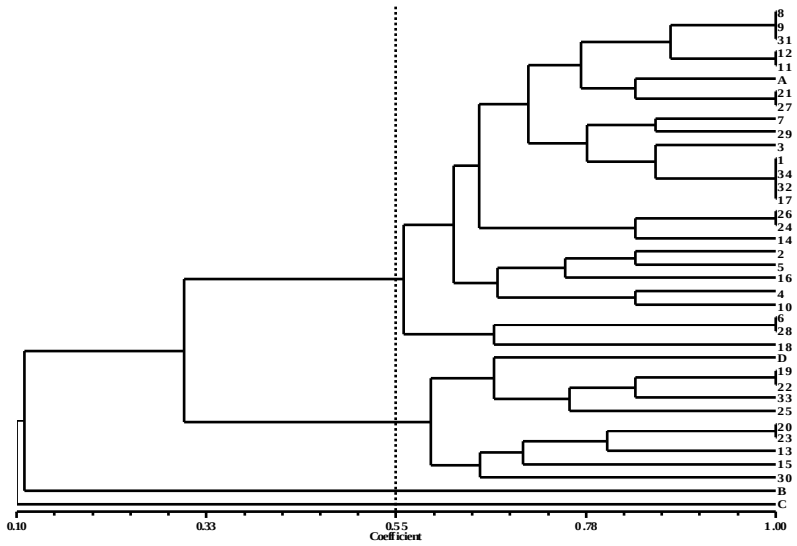


www.SID.ir

Archive of SID



از کشور از آن منطقه (تاکستان قزوین) گزارش شده است، هر دو گونه گالزا وجود داشته ولی گونه غالب عامل بیماری *R.vitis* است.




**شکل 4- دندروگرام الگوی اثر انگشتی استرین های بدست آمده از تاک و استرین های مرجع در آزمون IS50-PCR، A: استرین *Rhizobium vitis* ICMP10752، B: استرین *R.radiobacter* ICMP5856، C: استرین *R.rhizogenes* ICMP5794، D:استرین *R.rubi* ICMP6428**

**Figure 4- IS50-PCR dendrogram obtained by comparison of strains isolated from grapevine and reference strains. A: *Rhizobium vitis* ICMP10752; B: *R.radiobacter* ICMP 5856; C: R.rhizogenes ICMP 5794; D:*R.rubi* ICMP6428.**

در پژوهشی تنوع جمعیت های اگروباکتریوم بدست آمده از گیاهان باغی و زینتی درچند نقطه از کشور ارزیابی و استرین ها از نظر فنوتیپی به 3 گروه تقسیم بندی شدند و در آزمون BOX-PCR تنوع وسیعی را نشان دادند (Salehi *et al.*, 2004). در این گزارش نیز همانند نتایج بررسی های Javaheri et al. (2000) گونه غالب گالزا در تاک، از جمله در تاکستان های قزوین و کرج *R.radiobacter* شناسایی گردید. بر اساس گزارش های موجود از نظر تنوع و پراکندگی گونه های باکتری عامل بیماری گال طوقه مو، ناهمگونی گونه و سهم گونه ها در ایجاد بیماری به طور دقیق مشخص نبوده و تناقض هایی از این نظر دیده می شود، در مجموع بر اساس بیشتر گزارش های منتشر شده به نظر می رسد در اکثر مناطق کشور، بیشترین سهم را گونه *R.vitis* در ایجاد گال طوقه داشته است (Safdari *et al*,. 2010; Shahabi & Taghavi, 2010; Salehi *et al.*, 2004; Irani & Ghasemi, 2004; Javaheri *et al.*, 2000; Salahi-



www.SID.ir

Archive of SID



Ardakani *et al.*, 2000; Fatehi *et al.*, 1998; Ale-Yasin *et al.*, 1993).

در تحقیق حاضر، با نمونه برداری از گال طوقه و شاخه های تاک در استان های آذربایجان شرقی و غربی و کشت نمونه ها روی محیط های PDA، D1M و RS، 105 استرین به عنوان ریزوبیوم (اگروباکتریوم) شناسایی شد، 77 استرین پس از 4 روز از زمان کشت روی محیط RS تولید کلنی های سفید با مرکز قرمز رنگ کردند که مشخصه گونه *R.vitis*(*A.vitis*) می باشد (Bini *et al.*, 2008; Roy & Sasser, 1983)، لذا کارایی این محیط کشت در تفکیک اولیه گونه ها مناسب تر از دو محیط کشت دیگر تشخیص داده شد، درپژوهش دیگری نیز محیط RS به عنوان مهمترین محیط کشت برای جداسازی و شناسایی گونه های *Rhizobium* اعلام شده بود (Salahi-Ardakani *et al.*, 2000). در این تحقیق با بکارگیری آزمون های فنوتیپی تا حدی تنوع درون گونه ای استرین ها تعین گردید ولی برای شناسایی دقیق عامل بیماری و بررسی تنوع احتمالی استرین ها از آغازگرهای اختصاصی با توجه به حساسیت بالا و سرعت انجام از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد.

تعداد 92 استرین با استفاده از جفت آغازگر VirD2A/VirD2C قادر به تکثیر قطعه 224 جفت نوکلوتیدی از ژن *virD2* بودند که حاکی از وجود پلازمید Ti در استرین هایی است که قادر به تکثیر قطعه مورد نظر بودند، ولی استرین های G1 تا G7 با این که روی گوجه فرنگی گالزا بودند ولی نتوانستند با جفت آغازگر مذکور قطعه 224 جفت نوکلوتیدی را تکثیر کنند، لذا با توجه به نتایج Bini et al. (2008) این جفت پرایمر در همه استرین ها قادر به تکثیر قطعه مورد نظر نیست و برای تکثیر ژن *virD2* این گروه از استرین ها باید از جفت آغازگر VirD2A/VirD2E (Hass *et al.*, 1995) استفاده شود.

در این بررسی پس از انجام IS50-PCR اثر انگشت نگاری استرین ها به دست آمد، آنالیز خوشه ای داده های حاصل با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد نشان داد که استرین های ریزوبیوم (اگروباکتریوم) به دست آمده از مناطق مختلف استان آدربایجان شرقی و غربی دارای تنوع ژنتیکی هستند. در این بررسی مشخص شد که اثر انگشت ژنتیکی استرین ها با روش IS50-PCR می تواند به عنوان روشی کارا و مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی استرین های مختلف ریزوبیوم (اگروباکتریوم) مورد استفاده قرار گیرد. تحقیق حاضر نشانگر وجود تنوع در جمعیت های هر دو گونه *Rhizobium* در انگور، به ویژه وجود تنوع بیشتر و قابل تقسیم بودن استرین های *R.vitis* از نظر زمینه ژنتیکی است. تنوع استرین های *R.vitis* در تاکستان های آذربایجان شرقی می تواند نشانه سابقه طولانی تر باکتری در این استان و بروز تغییرها یا جهش هایی که به مرور زمان اتفاق افتاده، باشد.



www.SID.ir

Archive of SID



## منابع


Agrios G (2005). Plant Pathology. 5th Ed. Academic Press. New York. USA. 952pp.

Ale-Yasin SK, Banihashemi Z (1993). Isolation of causal agent of crown gall of grapevine in Fars and Kohkelueh and Boirahmad provinces. Proc. 11th, Iranian Plant Protection Congress. Guilan University. Rasht.214 pp.

Amani B (1966) Stem and root gall of grapevine. Iranian Journal of Plant Pathology 3: 12-18.

Arabi F, Nikravesh Z, Rezaeian V, Rahimian H (2002). Bacterial leaf spot of *Sisymbrium irio* in Tehran province. Proc. 16th, Iranian Plant Protection Congress. Tabriz University. Tabriz. p 253

Ausubl FM, Brent R, Kingestone RE, Moor DD, Smith JA, Seideman JG, Struhl K (1992). Current Protocol in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, Wiley Interscience, New York. 4757 p.

Bini F, Kuczmogu A, Putnoky P, Otten L, Bazzi C, Burr TJ, Szegedi E (2008). Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. Vitis 47: 181-189.

Bouzar H, Chilton WS, Nesme X, Dessaux Y, Vaudequin V, Petit A, Jones JB, Hodge CN (1995). A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. Applied and Environmental Microbiology 61: 65-73

Burr TJ, Katz BH (1983). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap and from vineyard soil. Phytopathology 73 :163-165.

Burr TJ, Katz B (1984). Grapevine cuttings as potential sites of surviving and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Disease 68: 976-978.

Burr TJ, Bazzi C, Sule S, Otten L (1998). Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Disease 82: 1288–1297.

Fatehi R, Mohammadi M, Rahmian H, Sharfi-Tehrani A, Zakeri Z (1998). Identification and phenotypic characterization of *Agrobacterium vitis* the causal agent of crown gall disease of grapes in Karaj and Takestan regions. Proc. 13th, Iranian Plant Protection Congress. Tehran University. Karaj. p 250.

Haas J, Moore L, Ream W, Manulis S (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology 61: 2879-2884.

Irani H, Ghasemi A (2004). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 (AT3)crown gall disease agent and study on population in sap and infected vineyards soil. Proc. 16th, Iran. Plant Protection Congress. Tabriz University. Tabriz. p 358.

Javaheri M, Mohammadi H, Rahimian H, Ghareyazi B (2000). Identification of Iranian strains of *Agrobacterium* isolated from grapevines using biovar3 specific primers and their Ti plasmid profiles. Proc. 14th, Iranian Plant Protection Congress. Isfahan University of Technology. Isfahan. p 138.

Roy M, Ssser M (1983). A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. Phytopathology 73: 810.

Safdari M, Rahimian H, Hejazi MA, Barzegari, A (2010). A study on the genotypic diversity of the regional *Agrobacterium* by means of REP-PCR and BOX-PCR. Proc. 19th, Iranian Plant Protection Congress. Iran. Research Institute of Plant Protection. Tehran. p 519.

Salahi-Ardakani A, Taghavi SM, Banihashemi Z( 2000). Distribution of crown gall grapevine and identification of strains of the causal agent in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad




www.SID.ir

Archive of SID



provinces. Proc. 14th, Iranian Plant Protection Congress. Isfahan University of Technology. Isfahan. p 137.

Salehi S, Rahimian H, Ghasemi A (2006). Diversity of *Agrobacterium tumefaciens* strains in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 42: 337-358.

Schaad NW, Jones BJ, Chun W (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed. APS. Press, St. Paul, MN U.S.A.379 pp.

Shahabi M, Taghavi SM (2010). Identification of pathogenic *Agrobacterium* species from different hosts by PCR. Proc. 19th, Iranian Plant Protection Congress. Iran. Research Institute. Plant. Protection. Tehran. p 512.

Sule S, Moszar J, Burr TJ (1994). Crown gall resistance *vitis* spp. and grapevine rootstocks. Phytopathology 48: 604-611.

Szegedi E, Bottka S (2002). Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi-selective medium. Vitis 41: 37-42.

Szegedi E, Bottka S, Mikuals J, Otten L, Sule S (2005). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. Vitis 44: 49-54.

Weingart H, Volksch B (1997). Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP, and IS50-PCR. Phytopathology 145: 339-345.

Willems A, Coolin MD (1993). Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16s rRNA gene sequence. International Journal of Systematic Bacteriology 43: 305-313.

Young JM, Kuykndall LD, Martinez E, Kerr A, Sawada H (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R.rhizogenes*, *R.rubi*, *R.undicola* and *R.vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 89-103.

Young, JM, Kuyknall DL, Martinez E, Sawada H (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and Rhizobium-a replay to Frrand *et al.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 1689-1695.



www.SID.ir

Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 1، بهار 1392)

# Determination of *Rhizobium* species and heterogeneity of strains causing grapevine crown gall disease by IS50-PCR

**Rouhrazi K[1]., Rahimian H[2].*** 

1-Ph.D Student of Plant Pathology, Dept. Plant Protection, Faculty of Agricultural, Buali-Sina University, Hamedan

2- Plant Bacteriology Laboratory, Dept. Plant Protection, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari.

**Abstract**

Crown gall is amongst the most important diseases of grapevine (*Vitis vinifera*) in many areas where grapevine is grown worldwide. To assess the diversity of *Rhizobium* species and strains, associated with the crown gall disease of grapevine in the major grapevine growing areas of northern Iran, 105 strains of the suspected bacterium were isolated from tumors of the crown and vines collected from vineyards in East and West Azarbayjan provinces. The strains were characterized by their phenotypic features, presence of virD2 and polygalacturonase genes and comparison of IS50-PCR fingerprints of the strains with those of the reference strains. Ninety two strains amplified a 224 bp fragment of the VirD2 gene in PCR reactions using VirD2A/VirD2C primers. Sixty four strains of *Rhizobium (Agrobacterium)* could amplify a 466 bp fragment with the primers PGF/PGR were identified as *R. vitis*. Strains were differentiated into 4 clusters at 55% similarity level of IS50-PCR generated fingerprint patterns. The majority of the strains formed subgroups in *R.vitis* cluster. Division of each of these two clusters into several subgroups at 80% similarity level reflected existence of a great level of diversity in population of both species.

**Keywords**: *Grapevine, Rhizobium, Polygalacturonase gene, IS50-PCR.*

* Corresponding Author: Rahimian H. Tel: 01513822563 Email: Rahimian.H@gmail.com



www.SID.ir