الگوی rep-PCR استرین‌های *Pectobacterium* جدا شده از سیب‌زمینی دارای علایم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه در استان همدان

فاطمه کاظمی[1]، غلام خداکرمیان[2]*، عزیز باقری[3] و ابوالقاسم قاسمی[4]

چکیده

استرین‌های وابسته به باکتری جنس *Pectobacterium* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی به‌ویژه سیب‌زمینی هستند. در استان همدان همه ساله گونه‌های مختلف این باکتری زیان‌های فراوانی را به بار می‌آورند. از مناطق مختلف کشت سیب زمینی در استان همدان نمونه‌های مشکوک و دارای علایم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه گردآوری و استرین‌های باکتریایی مشابه *Pectobacterium* رو ی محیط کشت EMB جدا و خالص سازی شدند. پس از اثبات بیماری‌زایی استرین‌های باکتری روی سیب-زمینی، تعداد 27 استرین برای بررسی ویژگی‌های فنوتیپی به‌منظور شناسایی، انتخاب شدند. استرین‌های باکتریایی مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های بیماری‌زایی و فنوتیپی از هم‌دیگر متمایز بودند. بر مبنای ویژگی‌های فنوتیپی بیشتر استرین‌های عامل بیماری سیب‌زمینی به‌عنوان *Pectobacterium carotovorum* و تعدادی نیز *Pectobacterium atrosepticum* شناسایی شدند. انگشت نگاری ژنومی استرین‌های انتخاب شده به‌روش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و Box انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V 2.2 و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA آنالیز شد. نتایج حاصل نشان داد که استرین‌های مورد آزمایش *P. carotovorum* و تعدادی نیز *P. atrosepticum* هستند. بررسی الگوی rep-PCR روشی سریع برای تشخیص و ردیابی استرین‌های *Pectobacterium* بیماریزای سیب‌زمینی است.

واژه‌های کلیدی: *Pectobacterium carotovorum*، ERIC، *Pectobacterium atrosepticum*، Box

Archive of SID

1. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد دامغان
2. دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
3. مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان همدان
4. بخش بیماری‌های گیاهی موسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی
*: نویسنده مسوول

www.SID.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی باکتری‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* هستند. این گروه از باکتری‌ها جزء مهم‌ترین پاتوژن‌های گیاهی بوده که نقش عمده‌ای در پایین آوردن کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و دارای گسترش جهانی هستند. یکی از ویژگی‌های مهم این گروه از باکتری‌ها، تولید مقدار زیادی از آنزیم‌های پکتولیتیک است که قدرت لهانیدن و تخریب فراوان بافت‌های نرم و پر آب را دارد. به‌علاوه استرین‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* دارای دامنه میزبانی گسترده بوده و اکثر گیاهان آب‌دار و گوشتی، میزبان یک یا تعداد بیشتری از گونه‌ها و یا زیرگونه‌های این جنس هستند. بیماری ساق سیاه ناشی از *P. atrosepticum* در فصول مرطوب و در مزارعی که به‌صورت غرقابی آبیاری می‌شوند، یک بیماری جدی است. بیماری‌های ساق سیاه، پوسیدگی نرم و پژمردگی سیب‌زمینی عموماً توسط گونه‌ها و زیرگونه‌های *P. carotovorum*، *P. atrosepticum* و *P. chrysanthemi* ایجاد می‌شوند که انتشار وسیعی در دنیا دارند. باکتری‌های گروه *Carotovora* از جنس *Pectobacterium* عمدتاً باعث ایجاد بیماری لهیدگی در بافت پارانشیمی گیاه میزبان می‌شوند که علائم اولیه در گیاهان در حال رشد متفاوت است. علائم این بیماری روی غده‌های سیب‌زمینی به صورت لهیدگی و پوسیدگی نرم غده (Tuber soft rot) و در ساقه به‌صورت ساق سیاه (Black leg) بروز می‌کند هوکر (Hooker 1981). در استان همدان به‌دلیل کشت وسیع سیب‌زمینی، وجود مایه تلقیح و هم‌چنین عدم کشت غده‌های بذری سالم و گواهی شده، بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه شیوع یافته و در بسیاری از موارد خسارت‌های فراوانی به این محصول وارد نموده و کشت این محصول را به‌شدت تهدید می‌کنند. هم‌چنین به‌دلیل این‌که سیب‌زمینی در این استان در سطح وسیع کشت می‌شود و سهم نسبتاً عمده‌ای در تأمین نیاز غذایی کشور دارد، لذا کاهش کمیت و کیفیت این محصول تأثیر زیادی در کاهش درآمد کشاورزان و هم‌چنین افزایش قیمت آن در بازار خواهد داشت (Bagheri & Taghavi 1993). استرین‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* که سبب بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه می‌شوند باکتری‌هایی گرم منفی، میله‌ای شکل با دو انتهای گرد به ابعاد 3-1×1-0/5 میکرومتر هستند. سلول‌ها اغلب به‌صورت تک یا جفت و گاهی به‌صورت زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند. اغلب دارای تاژک‌های متحرک و محیطی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند. میزان C+G در DNAی اعضاء این جنس 56/1- 50/5 درصد است، *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001).

انگشت نگاری ژنومی rep-PCR امکان استفاده از آغاز-گرها برای ردیابی توالی تکرار شونده DNA و حضور در ژنوم باکتری‌های گرم منفی و تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت را فراهم می‌کند، *لوپسکی* و وینستوک (Lupsiki & Weinstock 1993). در میان تعدد تکنیک‌های موجود برای تعیین ژنوتیپ، روش بررسی عناصر متقارن خارج-ژنی تکراری مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (rep-PCR) امکان رده‌بندی با دقت بالا را فراهم کرده است و به‌عنوان یک آشکارساز سریع برای ارزیابی تنوع ژنتیکی عمل می‌کنند، *لوئیس* و همکاران (Louws *et al.* 2003). تعداد سه خانواده از توالی تکراری که توسط لوپسکی و وینستوک (1993) شناسایی شده است، توالی متقارن. (Palinderomic) خارج ژنی تکراری (REP) به‌طول 35 تا 40 جفت نوکلئوتید، توالی عمومی بین ژنی تکراری درون باکتریایی (ERIC) به طول 124 تا 127 جفت نوکلئوتید و عناصر Box به طول 154جفت نوکلئوتید هستند. به نظر می‌رسد که این توالی‌ها در یک موقعیت ویژه در فاصله‌ای از ژن‌های خاص قرار گرفته‌اند. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز از هم جدا می‌شوند و یک الگوی باندی ویژه برای گونه و یا استرین به دست می‌آید، محمد و همکاران Mohammed & *et al.* (2009). هیمن و همکاران (Hyman *et al.* 2000) روش بر پایه PCR را برای ردیابی و تشخیص *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* دارای توانایی بالا دانسته است. *ترتا* و همکاران (Terta *et al.* 2010) با استفاده از روش PCR استرین‌های مختلف باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب زمینی در مراکش را از همدیگر تفکیک نمودند. با توجه به این‌که تشخیص و ردیابی سریع باکتری‌های بیماری‌زای در مزرعه و هم‌چنین در توده‌های بذری بسیار اهمیت دارد واز طرف دیگر روش‌های مبتنی بر تعیین ویژگی‌های فنوتیپی وقت‌گیر و پرهزینه است، روش بررسی الگوی rep-PCR می‌تواند برای تشخیص و ردیابی سریع مورد استفاده قرار گیرد. در این راستا این روش در مقایسه با روش تعیین ویژگی‌های فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت تا در تشخیص و ردیابی سریع باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی در استان همدان استفاده شود.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی استرین‌های باکتریایی

در سال‌های 1378 تا 1388طی بازدیدهای به عمل آمده از مزارع و انبارهای مختلف سیب‌زمینی استان همدان شامل بهار، لاله‌جین، دینارآباد، حسام‌باد، گنج‌تپه، کرفس، کبودرآهنگ، اسدآباد به‌صورت تصادفی از غده‌های آلوده در انبار و بوته‌های دارای علائم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه باکتریایی و مشکوک به آلودگی در مزرعه به‌طور تصادفی نمونه برداری شد. جهت جداسازی استرین‌های باکتریایی عامل بیماری، اندام‌های آلوده با آب معمولی شسته وسپس خشک شدند. از نمونه‌ها قطعات کوچکی از مرز بین بافت سالم و آلوده به کمک تیغ سترون جدا و در محلول حاوی 1% هیپوکلریت-سدیم به‌مدت 30 ثانیه قرار داده شد. سپس این قطعات دو بار با آب مقطر شسته شدند و در داخل لوله‌های حاوی آب مقطر سترون خرد گردیده و بعد از 20-30 دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک تا دو قطره توسط لوپ پلاتینی برداشته و روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو (EMB) مخطط گردیدند.

پس از دو روز نگهداری در دمای $^{\circ}C$ 28 کلونی‌هایی با رنگ سبز متالیک ظاهر شدند. جهت خالص سازی، دو تا سه کلونی سبز متالیک از هر تشتک پتری جدا و مجدداً روی محیط EMB به‌صورت خطی کشت شد. سپس از هر تشتک پتری یک تک کلون انتخاب گردیده و به‌عنوان یک استرین جهت انجام آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی روی محیط‌های کشت سوکروز پپتون آگار(SPA) و آگار غذایی(NA) به‌صورت خطی یا نقطه‌ای نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری

آزمون‌هایی فنوتیپی برای شناسایی گونه‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* شامل آزمون گرم، حلالیت در پتاس سه درصد، رشد هوازی و بی‌هوازی، اکسیداز، کاتالاز، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، لسیتیناز، فسفاتاز، رشد در دمای 39 و 40 درجه‌سانتی‌گراد، تولید سولفید هیدروژن از سیستئین، احیاء نیترات، هیدرولیز نشاسته، اسکولین و توئین 80، آرژنین دی‌هیدرولاز و فوق حساسیت در شمعدانی به روش‌های استاندارد باکتری شناسی بود *شاد* و همکاران (2001).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای استخراج DNA، باکتری‌ها به مدت 24 ساعت روی محیط آگار غذایی کشت داده شدند. پس از رشد باکتری-ها سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^7 از هر باکتری در آب تهیه گردید. از روش لیز قلیایی (alkaline lysis) برای آزاد-سازی DNA استفاده شد .به این منظور10 میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با 100 میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم 0/05 مولار مخلوط و به‌مدت 15 دقیقه در 95 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس سوسپانسیون به‌مدت دو دقیقه در 14000 rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به تیوب‌های تمیز منتقل و جهت استفاده در انجام واکنش‌های PCR در دمای20- نگهداری گردید *رادماکر* و همکاران (Rademaker *et al*. 1997). تنوع استرین-های باکتریایی جدا شده با آغازگرهای ERIC و BOX بررسی شد *ورسالویک* و همکاران (Versalovic *et al*.1997). توالی پرایمرهای ERIC شامل ERIC 1Rever 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC- 3 و ERIC 2Forward 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3' و هم‌چنین BOX A1Reverse 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3' بود. برای واکنش PCR واسرشت سازی ابتدایی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه، واسرشت سازی در دمای 92 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه در 35 چرخه و گسترش نهایی در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به‌مدت هشت دقیقه انجام گرفت. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد با ولتاژ 90 الکتروفورز و در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و برای عکس-برداری از دستگاه Gel document استفاده شد. دندروگرام الگوی rep-PCR بر اساس وجود یا عدم وجود باند، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V.2. 2 و بر اساس روش داده‌های جفت شده غیر وزنی (UPGMA) و ضریب ژاکارد (Jacard) ترسیم شد.

نتایج و بحث

همه استرین‌های مورد بررسی گرم منفی و واکنش‌های اکسیداز، فسفاتاز، لسیتیناز، آرژنین دی‌هیدرولاز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری بودند. این استرین‌ها قادر به احیاء نیترات به نیتریت، تولید گاز سولفید هیدروژن از سیستئین و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. تمامی استرین‌ها از ال-رامنوز، ترهالوز، ملی‌بیوز و رافینوز اسید تولید نموده و اسکولین را هیدرولیز کرده ولی قادر به هیدرولیز نشاسته نبودند. استرین‌های مورد بررسی قادر به رشد روی سیترات و فوق حساسیت در شمعدانی بودند ولی توانایی مصرف ال- آلانین و هیدرولیز توئین80 نداشتند. بر مبنای ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بررسی و آزمون بیماری‌زایی، بیشتر استرین‌های عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی به‌عنوان *P. carotovorum* و تعداد کمی به‌عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

P. atrosepticum تشخیص داده شدند. این نتایج با *یافته‌های جانز و راسن* (Jans & Ruissen 1988) و *شاد* و همکاران (2001) مطابقت دارد. ویژگی‌های بررسی شده استرین‌های باکتریایی در جدول شماره یک آورده شده است.

پس از بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های جداشده، 11 استرین به‌عنوان نماینده انتخاب شدند. DNA ژنومی این استرین‌ها به همراه استرین‌های استاندارد به روش انگشت‌نگاری ژنومی rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل-های 1 و 2) و دندروگرام آن‌ها رسم شد (شکل 3).

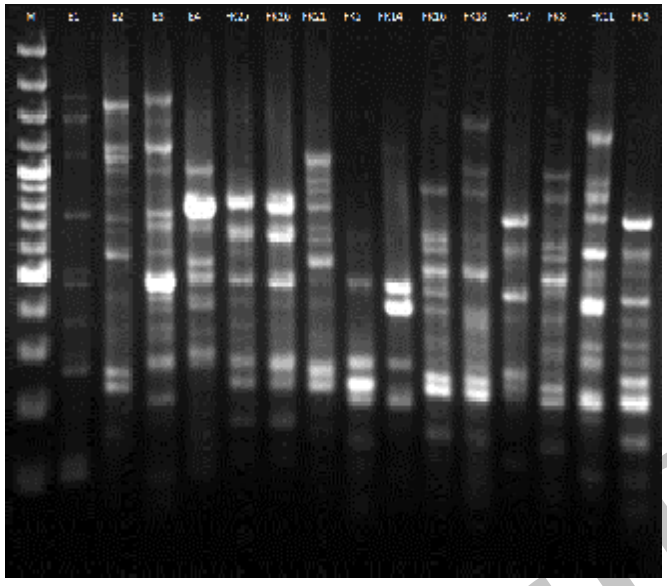
جدول 1: ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان
Table 1: Phenotypic features of the strains of bacterial strains causing potato soft rot in Hamedan provice.

ویژگی	واکنش	ویژگی	واکنش
گرم Gram	-	احیای نیترات Nitrate reduction	+
تولید رنگ فلورسنت روی محیط KB Flourescent pigment on KB medium.	-	تولید SH_2 ازسیستئین SH2 from cystein	+
اکسیداز Oxidase	-	شیر لیتموس Litmus milk alkaline	
کاتالاز Catalase	+	رشد در 36 سانتی‌گراد Growth at 36ºC	v
رشد هوازی بی هوازی Oxidative/Fermantative	F	رشد در 39 سانتی‌گراد Growth at 39ºC	-
تولید پیگمان آبی روی محیط YDC Blue pigment on YDC medium	-v	فسفاتاز Phosphatase	-
لهاندن ورقه‌های سیب‌زمینی Potato rot	+	فوق حساسیت در شمعدانی Hypersensitivity on geranium	+
لسیتیناز Lecitinase	-	سیترات Citrate	+
تولید اندول Indol	v	تولید اسید از ترهالوز Acid from trehalose	+
مصرف آرژنین Arginine	-	استفاده از دی-تارتارات D - tratarate	-
تشکیل لوان از سوکروز Levan from sucrose	v	تولید اسید از آرابیتول Acid from arabitol	v
رشد در کلرید سدیم 5% Growth in % NaCl	V	تولید اسید از رافینوز Acid from raffinose	+
هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis	v	استفاده از مالونات Malonate	-
تولید مواد احیا کننده از سوکروز Reducing substances from sucrose	v	تولید اسید از ال-رامنوز Acid from l- rhamnose	+
هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis	V	استفاده از ال- لاکتات L - lactate	-
هیدرولیزتوئین 80 Tween 80 hydrolysis	-	استفاده از ال-الانین L - alanine	-
هیدرولیزاسکولین Aesculin hydrolysis	+	تولید اسید از ملی‌بیوز Acid from melibiose	+
هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis	-	استفاده از ال-گلوتامات L - glutamate	+

+: 80% یا بیشتر استرین‌ها واکنش مثبت، -: 20% یا کمتر استرین‌ها واکنش منفی ، V: 21-79 % استرین‌ها واکنش مثبت
+,80% or more strains positive; V, between 21-79% of strains positive; -,80% or more strains negative

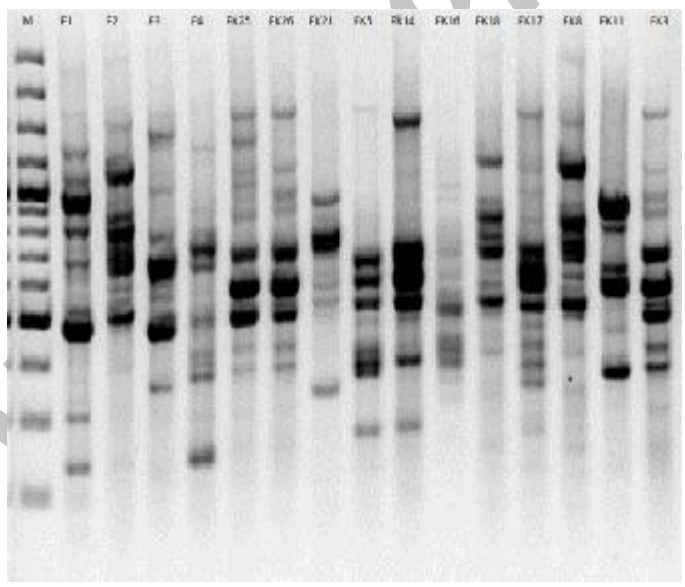
Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1: الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و *Dickeya dianthicola* (E1)، *Pectobacterium carotovorum* (E2)، *P. atrosepticum* (E3) و *P. chrysanthemi* (E4) با استفاده از آغازگر ERIC

Figure 1: rep- PCR pattern among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum* using ERIC primers

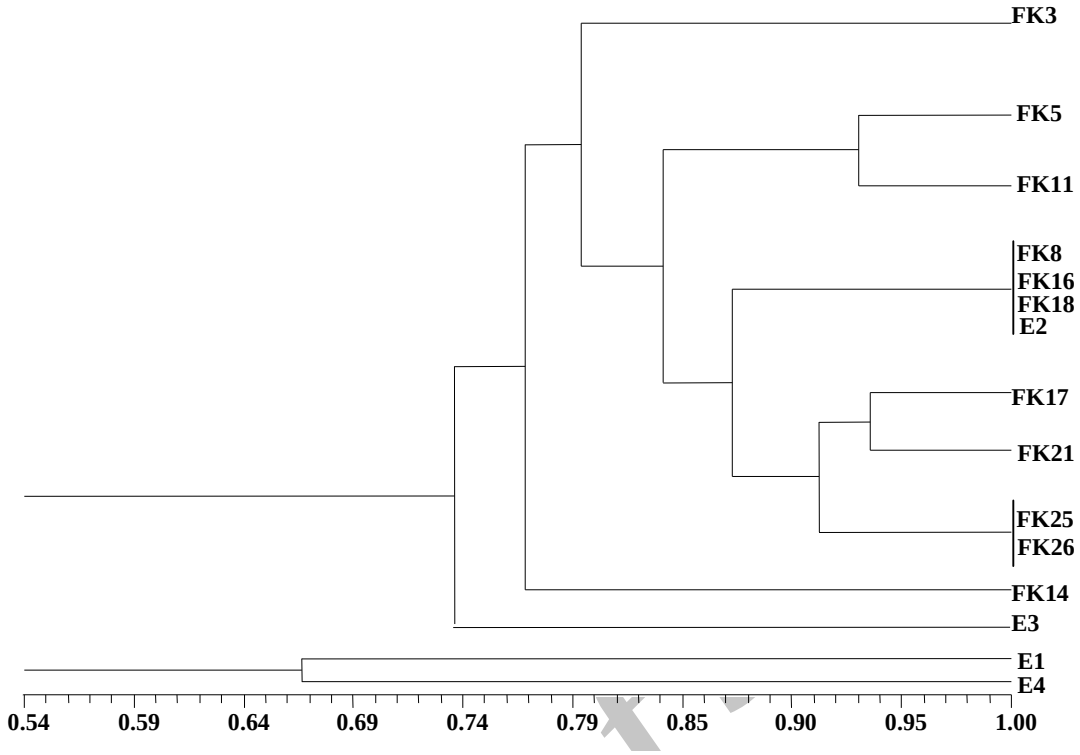


شکل 2: الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و *Dickeya dianthicola* (E1)، *Pectobacterium carotovorum* (E2)، *P. atrosepticum* (E3) و *P. chrysanthemi* (E4) با استفاده از آغازگر BOX

Figure 2: rep- PCR pattern among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum* using BOX

www.SID.ir

primers



شکل 3: دندروگرام الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و *Dickeya dianthicola* (E1)، *Pectobacterium carotovorum* (E2)، *P. atrosepticum* (E3) و *P. chrysanthemi* (E4)

Figure 3: Rep- PCR pattern dendrogram among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum*

نتایج بررسی الگوی rep-PCR و رسم دندروگرام آن نشان داد که استرین‌های FK8، FK16 و FK18 جدا شده از بهار و E2 (*P. carotovorum*) در یک گروه، استرین FK3 جدا شده از اسدآباد در یک گروه، استرین FK14 جدا شده از کبودرآهنگ در یک گروه و استرین‌های FK25 و FK26 جدا شده از لالجین در گروهی جدا قرار گرفتند. این نتایج نشان داد که استرین‌های باکتری عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی از نظر منطقه جغرافیایی تفکیک پذیر هستند و تفاوت در بیماری‌زایی می‌تواند تنوع موجود در استرین‌های مختلف را توجیه کند. نتایج بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی نشان داد که نتایج این دو روش با هم هم‌خوانی داشته و استرین‌های مورد آزمایش را از هم‌دیگر تفکیک نمودند و با نتایج *ورسالوویک* و همکاران (1997) سازگاری دارد. این پژوهش‌گران، تنوع ژنتیکی استرین‌های *P. carotovorum* را با استفاده از انگشت‌نگاری ژنومی rep-PCR مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که استرین‌های مورد بررسی دارای باندهای 150 تا 5090 pb بودند و تعداد باندهای تشکیل شده 6 تا 12 باند بود که پس از رسم دندروگرام قابل تفکیک بودند و در خوشه‌های جداگانه قرار گرفتند. *رادماکر* و همکاران (1997)، پس از مقایسه روش‌های مختلف برای تعیین تنوع ژنتیکی بین استرین-های *Pectobacterium* عامل ساق سیاه سیب‌زمینی نتیجه گرفتند که روش rep-PCR برای آنالیز ژنوم این استرین‌ها بسیار مناسب و تفکیک کننده است و به دیگر تکنیک‌های انگشت‌نگاری ژنومی برای این هدف برتری دارد. هیمن و همکاران (2000) روش بر پایه PCR را برای ردیابی *Erwinia carotovora* subsp**.** *atroseptica* موثر دانستند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. *ترتا* و همکاران (2010) با استفاده از روش PCR استرین‌های مختلف باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم را از هم‌دیگر تفکیک نمودند.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 11-12 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir