Archive of SID

بررسی خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی عامل بلایت گردو در استان‌های فارس و لرستان

Genotypic and Phenotypic Diversity of the Casual agent of Bacterial Blight of Walnut in Fars and Lorestan Provinces

حسین میرزایی نجفقلی[۱]، سیدمحسن تقوی[۲*] و میلاد آیینی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۰۱

چکیده

طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰، ۲۴ جدایه باکتری از درختان گردو آلوده به بلایت باکتریایی از استان‌های فارس و لرستان جداسازی شد. به‌منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی و rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و REP انجام گردید. سویه‌های مورد بررسی، گِرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، قادر به هیدرولیز آسکولین، تولید H_2S از سیستئین و استفاده از قندهای گلوکز، سوکروز، دی‌مانوز و دی‌سوربیتول بودند. جدایه‌ها تفاوت کمی در هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز نشاسته، تحمل به نمک‌طعام ۳ درصد و استفاده از قند ال‌آلانین داشتند. همچنین آزمون‌های بیماری‌زایی و آنتی‌بیوگرام روی جدایه‌ها انجام شد. براساس خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی و تکثیر قطعه ۴۱۳ جفت بازی با آغازگر rev_seq در واکنش PCR، جدایه‌های مذکور به‌عنوان *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* تشخیص داده شدند. بر پایه آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها تقریباً همگن و بیش از ۸۷ درصد شباهت داشتند. سویه‌ها براساس rep-PCR با استفاده از آغازگرهای مذکور در دو گروه اصلی قرار گرفتند. در مجموع سویه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مشابه بودند و استفاده از rep-PCR نتوانست سویه‌ها را براساس منشاء جغرافیایی از هم تفکیک نماید. همچنین این اولین گزارش از بیماری باکتریایی بلایت گردو از استان فارس است.

واژه‌های کلیدی: بلایت باکتریایی، فنوتیپ، ژنوتیپ

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز
۲. استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز
۳. دانشجوی دوره دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان، همدان
*: نویسنده مسوول Email: mtaghavi@shirazu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری بلایت گردو نخستین بار در دنیا توسط بریتل گزارش گردید. سپس پیرس باکتری عامل بیماری را جداسازی و اثبات بیماری‌زایی نمود و نام آن را *Pseudomonas juglandis* نامید، پیرس (Pierce, 1901). در سال‌های بعد بر روی طبقه‌بندی آن مطالعات بیشتری انجام شد و محققین مختلف آن را *Bacterium juglandis*، *Phytomonas juglandis*، *Xanthomonas juglandis* و *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* نامیدند، *اسمیت*؛ *برگی* و همکاران؛ *داوسون*؛ *دای* و همکاران (Smith, 1905; Bergey *et al*., 1930; Dowson, 1939; Dye et al., 1980). در نهایت واتورین آن را در گونه جدید *X. arboricola* و به‌عنوان پاتووار *Juglandis* قرار داد. عامل بیماری یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی اجباری، دارای یک تاژک قطبی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و قادر به تولید زانتامونادین می‌باشد که سبب ایجاد بیماری بلایت گردو می‌شود. در این بیماری قسمت‌های مختلف درخت مانند جوانه، برگ، دمبرگ، دمگل، سرشاخه، شاتون، مادگی، میوه‌چه و مغز گردو مورد حمله قرار می‌گیرد و در آلودگی‌های شدید سبب خسارت ۵۰ درصدی محصول می گردد، *گراسین* و همکاران؛ *بلیساریو* و همکاران (Garcin *et al*., 2001; Belisario, *et al*., 1997). علائم بیماری در برگ‌ها، ابتدا به‌صورت نقاط کوچک آب‌سوخته می‌باشد، که پس از توسعه، ایجاد لکه‌های ۴-۲ میلی‌متری بافت مرده زاویه‌ای می‌کند، *آرک* (Ark, 1944) و چنانچه آلودگی در برگ‌های در حال رشد اتفاق بیافتد سبب بدشکلی برگ می‌گردد (گل‌محمدی و همکاران، ۱۳۸۱). علائم روی سرشاخه‌ها، ابتدا به‌صورت نقاط بسیار ریز نیمه شفاف و آبسوخته است که با توسعه بیماری حالت شانکر می‌گیرند. اندام‌های جوان و در حال رشد به این بیماری حساس و با بالغ شدن نسبت به این بیماری مقاوم‌تر می شوند، (*بلیساریو* و همکاران، 1997). ارقام مختلف گردو نسبت به بیماری بلایت باکتریایی از نظر حساسیت متفاوت می‌باشند، اما هیچ گونه ارقام مقاومی یافت نشده است، *تامپونی* و *دوناتی* (Tamponi and Donati, 1990).

گل‌محمدی و همکاران (۱۳۸۱) با بررسی بیماری بلایت باکتریایی و پوسیدگی مغز گردو (استان‌های مرکزی و شمالی کشور) و تعیین تعدادی از خصوصیات فنوتیپی، بیماریزایی و الکتروفوزر پروتئین‌های سلولی، نشان دادند که این جدایه‌ها از لحاظ این خصوصیات همگن می‌باشند. همچنین *اسکورتیچینی* و همکاران (Scortichini *et al*., 2001) از درختان گردو، کلکسیون‌های کشت بین‌المللی و آزمایشگاه‌های بیماری‌های گیاهی از سراسر جهان ۶۱ جدایه باکتریایی *X. arboricola* pv. *juglandis* جمع‌آوری و به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی از مجموعه آغازگرهای BOX، ERIC و REP استفاده نمودند. در این بررسی آنالیزهای خوشه‌ای وجود سه گروه بزرگ از استرین‌ها را نشان دادند که دو گروه اول دارای ۸۵ درصد شباهت ژنتیکی بودند. درحالی‌که گروه سوم ۷۸ درصد شباهت با دو گروه دیگر را نشان داد، *اسکورتیچینی* و همکاران (2001).

با توجه به اهمیت اقتصادی و مشاهده علائم مشابه با بیماری بلایت گردو در استان‌های فارس و لرستان، هدف از این تحقیق ردیابی، تشخیص و بررسی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی عامل بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰، از مناطق مختلف استان‌های فارس و لرستان نمونه‌های مشکوک به آلودگی بلایت گردو از قسمت‌های برگ، میوه و شاخه جمع‌آوری گردید. به‌منظور جداسازی عامل بیماری، اندام‌های آلوده با مایع سفیدکننده تجارتی ۱۰٪ ضدعفونی و در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. سپس از قطعات آلوده در آب مقطر سوسپانسیون تهیه و یک لوپ از آن روی محیط‌کشت NA (Nutrient Agar) به روش خطی کشت گردید. پرگنه‌ها در محیط‌کشت NA خالص و در نهایت تعداد ۲۴ جدایه زانتوموناس جدا گردید. همچنین از یک جدایه استاندارد ایتالیا و یک جدایه از زنجان به‌عنوان شاهد در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژی

۲۶ جدایه براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژی و خصوصیات تغذیه‌ای زیر با هم مقایسه شدند. واکنش گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی، فوق حساسیت در توتون، آرژنین دهیدرولاز، تولید رنگ زرد روی YDC، هیدرولیز آسکولین، تولید گاز H_2S از سیستئین، تولید رنگدانه فلورسنت، اوره‌از تولید اندول، لوان، هیدرولیز توئین ۸۰ (لیپاز)، رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تحمل نمک طعام ۲، ۲/۵ و ۳ درصد، استفاده از قندها، اسیدهای آمینه و الکل‌های آلی در محیط پایه Ayers شامل گلوکز، سوکروز، سلوبیوز، دی‌ریبوز، دی سوربیتول، ال رامنوز، دی مانیتول، دی‌مانوز، ال والین، ال هیستیدین، ال سرین، دی‌آلانین، ال آرابینوز، ال ایزولوسین، ال آسپارژین، ال آلانین، دی ملی‌بیوز، ال آرابیتول، *شاد* و

www.SID.ir

Archive of SID

همکـاران، *سوسـلاو* و همکـاران؛ *کـاوواکس*؛ *هـوگ و لیفسـون*؛ *لیلیوت* و همکاران؛ *فهی و پارسلی*؛ *هـایوارد*؛ *ترونلـی*؛ *کلمنـت* و همکاران؛ *دای*؛ *مک فـادین* (Schaad *et al.*, 2001; Suslow *et al.*, 1982; Kovacs, 1956; Hugh and Leifson, 1953; Lelliott *et al.*, 1966; Fahy and Persley, 1983; Hayward, 1964; Thornley, 1960; Klement *et al.*, 1964; Dye, 1968; Macfadin, 1980).

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های عامل بلایت گردو در استان های فارس و لرستان

Table 1: Characteristics of walnut bacterial blight strains from Fars and Lorestan provinces

کد جدایه Strain code	محل جمع‌آوری Region collect	استان Province	بافت گیاهی Plant
A1	الشتر Alashtar	لرستان Lorestan	برگ Leaf
A2	الشتر Alashtar	لرستان Lorestan	برگ Leaf
A3	الشتر Alashtar	لرستان Lorestan	برگ Leaf
A4	الشتر Alashtar	لرستان Lorestan	میوه Fruit
K1	خرم آباد Khorramabad	لرستان Lorestan	برگ Leaf
K2	خرم آباد Khorramabad	لرستان Lorestan	میوه fruit
K3	خرم آباد Khorramabad	لرستان Lorestan	میوه fruit
B1	بروجرد Borujerd	لرستان Lorestan	برگ Leaf
B2	بروجرد Borujerd	لرستان Lorestan	برگ Leaf
N1	نورآباد Norabad	لرستان Lorestan	برگ Leaf
N2	نورآباد Noor Abad	لرستان Lorestan	میوه fruit
N3	نورآباد Noor Abad	لرستان Lorestan	میوه fruit
D1	دورود Dorood	لرستان Lorestan	برگ Leaf
D2	دورود Dorood	لرستان Lorestan	میوه fruit
S1	سپیدان Sepidan	فارس Fars	برگ Leaf
S2	سپیدان Sepidan	فارس Fars	میوه fruit
Ba1	بوانات Bavanat	فارس Fars	میوه fruit
Ba2	بوانات Bavanat	فارس Fars	میوه fruit
Ba3	بوانات Bavanat	فارس Fars	میوه fruit
Ba4	بوانات Bavanat	فارس Fars	برگ Leaf
E1	اقلید Eqlid	فارس Fars	برگ Leaf
E3	اقلید Eqlid	فارس Fars	برگ Leaf
Gh	قلات Ghalat	فارس Fars	برگ Leaf
Be	بهشت گمشده Beheshte gomshodeh	فارس Fars	برگ Leaf
IT	ایتالیا (اهدایی دکتر معرفت)		
Za	زنجان (اهدایی دکتر معرفت)	زنجان Zanjan	

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون آنتی‌بیوگرام

به‌منظور تعیین میزان حساسیت جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌ها، از دیسک‌های تجارتی آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون 10^8 cfu/ml از جدایه‌ها تهیه و با میله‌ای L شکل به‌طور یکنواخت روی محیط‌کشت NA پخش گردید. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به کمک یک انبرک سترون به فاصله حدود ۳ سانتی‌متر از یکدیگر، بر روی محیط‌های کشت حاوی باکتری قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت نتایج براساس وجود یا عدم‌وجود هاله بازدارنده (Inhibition zone) و قطر هاله بازدارنده ثبت گردید (*شاد* و همکاران، ۲۰۰۱).

آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این آزمون عبارت بودند از: آمیکاسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، وانکومایسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، سفتازیدیم (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، توبرامایسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میلی‌گرم در دیسک)، پنی‌سیلین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، سفالوسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، کانامایسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، کلوکساسیلین (۱ میلی‌گرم در دیسک)، تری متوپریم سولفامتوکسازول، آموکسی‌سیلین (۲۵ میلی‌گرم در دیسک)، اوکساسیلین (۱ میلی‌گرم در دیسک)، نورفلوکساسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میلی‌گرم در دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی‌گرم در دیسک) و تتراسایکلین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک).

آزمون بیماری‌زایی

این آزمون روی میوه و نهال‌های یکساله گردو در گلخانه انجام شد، ابتدا سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه گردید. سپس با سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و یک قطره از سوسپانسیون باکتری روی آن قرار داده شد. به‌منظور تامین رطوبت گلدان‌ها، از کیسه‌های پلاستیکی به‌مدت ۷۲ ساعت استفاده شد، سپس گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از سه هفته نهال‌هایِ مایه‌زنی شده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین آزمون بیماری‌زایی روی میوه گردو در شرایط آزمایشگاه انجام گرفت. در این آزمون ابتدا سطح میوه‌ها به‌وسیله الکل اتیلیک ضدعفونی و میوه‌ها داخل ظرف پلاستیکی شفاف قرار داده شدند. سپس روی میوه‌ها با سوزن زخم‌هایی ایجاد گردید و یک قطره از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^6 cfu/ml روی میوه‌ها قرار داده شد. به‌منظور تأمین رطوبت داخل ظرف پنبه‌های سترون مرطوب قرار داده و ظرف داخل کیسه پلاستیکی در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ روز نگه‌داری شد.

تشخیص باکتری Xaj با آغازگرهای اختصاصی

برای تشخیص نهایی باکتری *Xaj* از آغازگر rev_seq،

5-AGCATGACGTCATCGTCT-3
5-CAATTATTTAGGGACTCG-3

(زاده محمد و معرفت، ۱۳۸۹) طراحی شده براساس ژن *16S rRNA* استفاده شد. یک لوپ از پرگنه‌های باکتری روی محیط‌کشت NA برداشته شد و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل گردید. به‌منظور استخراج دی‌اِن‌ای، نمونه‌ها در یک ظرف حاوی آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله به‌مدت چند دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفیوژ و از فاز رویی برای انجام آزمون PCR استفاده گردید.

برای انجام آزمون PCR محلول پایه ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش تهیه گردید که شامل تمامی مواد مورد نیاز برای واکنش PCR بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی شامل واسرشت‌سازی مقدماتی ۴ دقیقه در **C**°۹۴، ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در **C**°۹۳، اتصال ۳۰ ثانیه در **C**°۶۲، سنتز یک دقیقه در **C**°۷۲ و سنتز نهایی ۱۰ دقیقه در **C**°۷۲ صورت گرفت. مواد و مقدار مورد استفاده برای واکنش PCR، شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)، ۱/۵ میکرولیتر MgCl2 (2.5mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase (10U/ µl)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت (10µM)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (10µM)، ۳ میکرولیتر DNA و ۱۵/۲۵ میکرولیترآب سترون.

آزمون rep-PCR

جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری *Xaj* از روش rep-PCR و آغازگرهای REP1R/REP2I، ERIC1R/ERIC2 و BOXA1R برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده استفاده گردید *ورسالویک* و همکاران (Versalovic *et al.*, 1991). ترادف آغازگرهای مورد استفاده برای روش rep-PCR به‌ترتیب در جدول ۱ آورده شده است. چرخه حرارتی واکنش rep-PCR شامل دو چرخه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۳°C به‌مدت ۱۲۰ و ۲ ثانیه، ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل سه مرحله واسرشت‌سازی در ۹۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرهای Rep، Eric و Box به‌ترتیب در ۴۲°C، ۵۳°C و ۵۲°C و سنتز در ۷۲°C به‌مدت ۸ دقیقه و یک چرخه نهایی سنتز در ۷۲°C به‌مدت ۸ دقیقه بود. مواد لازم برای انجام

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش rep-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر عبارتند از: ۰/۸۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (50mM؛ ۲/۶ میکرولیتر PCR buffer 10X؛ ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10µM)؛ ۰/۴ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase (5U/µl)؛ ۱/۲ میکرولیتر آغازگر رفت (10µM)؛ ۱/۲ میکرولیتر آغازگر برگشت (10µM)؛ ۲/۵ میکرولیتر DNA و ۱۵/۷۵ میکرولیتر آب مقطر سترون.

آنالیز داده‌های ژنوتیپی

با استفاده از نرم‌افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Ntsys-pc 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید، *رولف* (Rohlf, 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم‌وجود باند در ژل مشخص شد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش مراتبی (Hierachical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted Pair-Group method using (UPGMA) Arithemtic Average و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده گردید. استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر متداول‌تر است، زیرا خصوصیات همه اعضای مربوط به دو کلاستر را پوشش می‌دهد. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، براساس کلیه خصوصیات ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید.

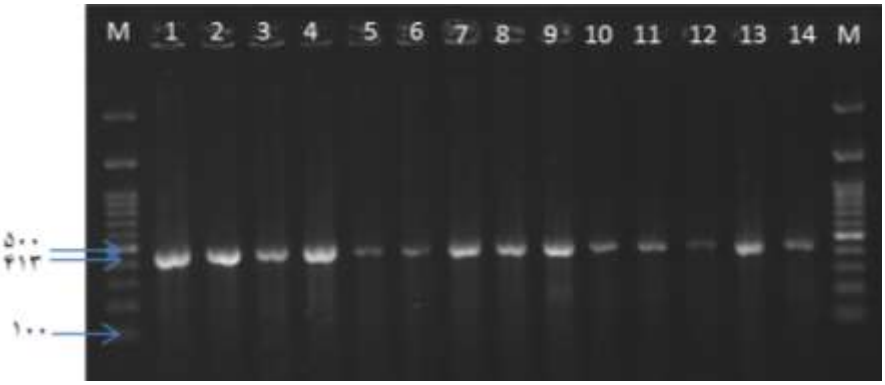
نتایج

از درختان گردو که علایم بلایت را نشان می‌دادند، ۲۴ جدایه گرم منفی، دارای پرگنه‌های زرد، صاف، مدور، براق با حاشیه منظم روی محیط‌کشت NA جداسازی گردید. سایر خصوصیات فنوتیپی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی در rep-PCR

Table 2: Primer sequnces used in rep-PCR

آغازگر Primer	توالی (′3 -′5) Sequence	منبع Source
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC	Versalovic *et al*., 1991
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Versalovic *et al*., 1991
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic *et al*., 1994
REP1R	IIIICGICGICATCIGGC	Versalovic *et al*., 1991
REP2I	ICGICTTATCIGGCCTAC	Versalovic *et al*., 1991

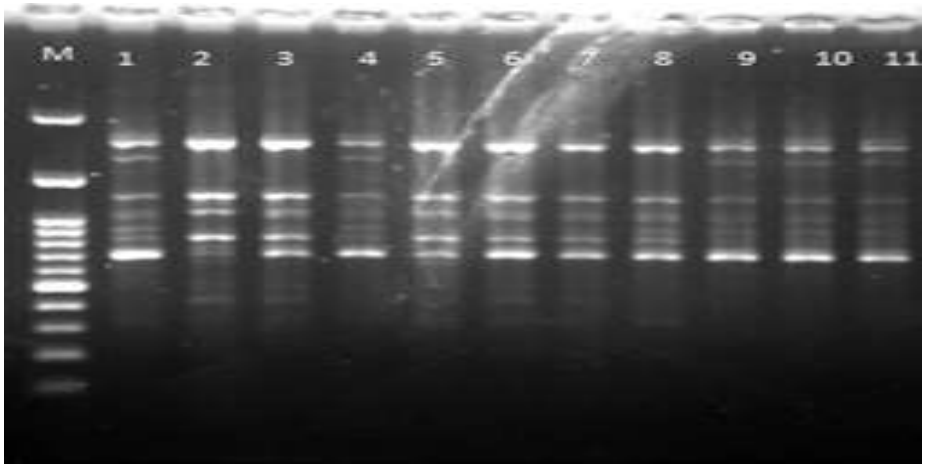


شکل ۱: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* جدا شده از استان‌های فارس و لرستان با آغازگر اختصاصی rev_seq

Fig. 1: Agarose gel electrophoresis of PCR-products of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains isolated from Fars and Lorestan provinces with specific primer rev_seq

www.SID.ir

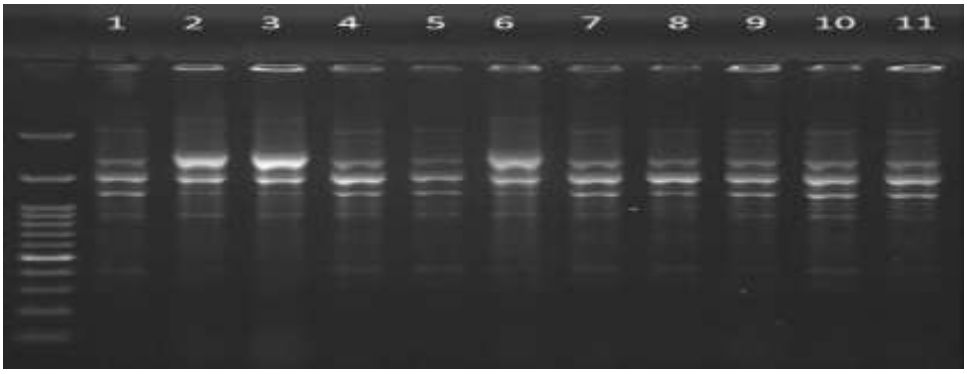
Archive of SID



شکل ۲: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola pv. juglandis* با استفاده از آغازگر ERIC

۱: E_1، ۲: Gh، ۳: Be، ۴: A_4، ۵: K_2، ۶: E_3، ۷: S_1، ۸: E_2، ۹: A_1، ۱۰: A_2، ۱۱: K_1، M: ۱۰۰ جفت بازی

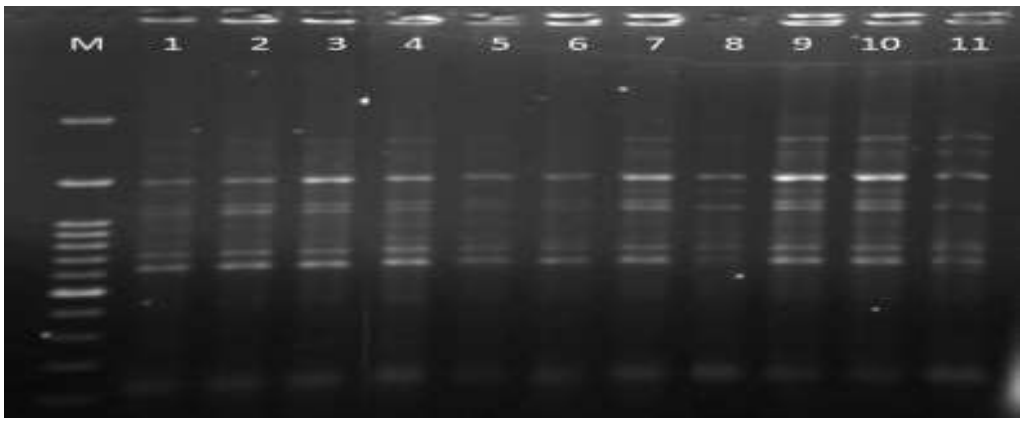
Fig. 2: ERIC-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *Juglandis* strains
1:E1. 2:Gh. 3:Be. 4:A4. 5:k2. 6:E3. 7:S1. 8:E2. 9:A1. 10: A2. 11:K1. M:100 base pair



شکل ۳: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر BOX

۱: Ba_1، ۲: Gh_1، ۳: Be، ۴: S_1، ۵: Ba_3، ۶: E_3، ۷: E_2، ۸: B_2، ۹: A_1، ۱۰: A_3، ۱۱: B_1، M: ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 3: Box-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains
1:Ba1, 2: Gh_1, 3:Be. 4:S_1, 5:Ba_3, 6:E_3, 7:E_2, 8:B_2, 9:A_1, 10:A_3, 11:B_1, M:100 base pair



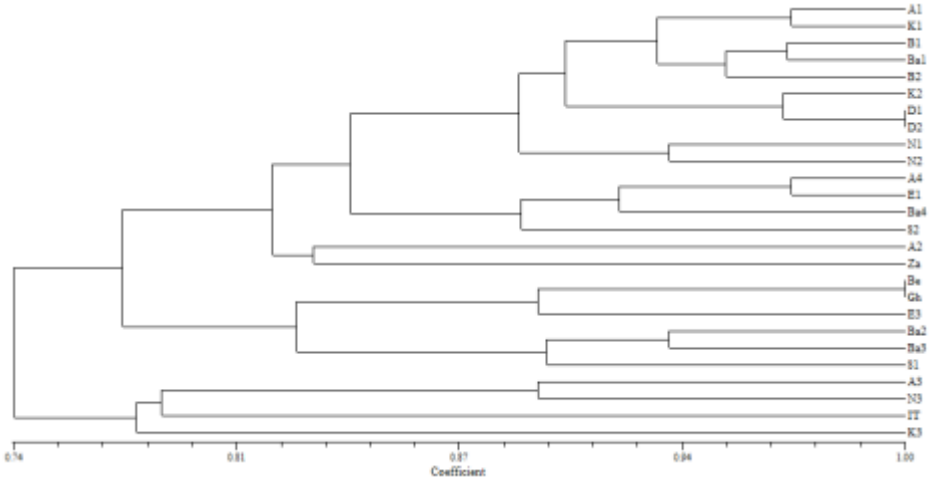
شکل ۴: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola pv. juglandis* با استفاده از آغازگر REP

۱: A_2، ۲: B_1، ۳: B_2، ۴: D_1، ۵: K2، ۶: D_1، ۷: Gh، ۸: E_2، ۹: E_1، ۱۰: E_3، ۱۱: Ba_1، M: ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 4: REP-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains
1:A_2, 2:B_1, 3: B_2, 4:D_1, 5:K_2, 6:D_1, 7:Gh, 8: E_2, 9:E_1, 10:E_3, 11:Be, M:100 base pair

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: دندروگرام جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* براساس rep-PCR با آغازگرهای BOX، ERIC و REP

Fig. 5: Combined dendrogram of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains based on rep-PCR

آزمون بیماری‌زایی

در آزمون اثبات بیماری‌زایی، علائم سه هفته بعد از مایه‌زنی به صورت نقاط نکروزه با حاشیه زرد بر روی برگ‌ها مشاهده گردید. به‌منظور اجرای اصول کخ، بعد از مایه‌زنی از برگ‌های دارای علائم نمونه‌برداری و جداسازی مجدد باکتری صورت گرفت. همچنین در آزمون بیماری‌زایی روی میوه، میوه‌ها بعد از ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند که علائم روی میوه‌ها به‌صورت سیاه‌شدگی میوه و خروج تراوشات سفید رنگ از میوه مشاهده گردید.

آزمون آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این آزمون و چگونگی واکنش جدایه‌های مختلف باکتری، در جدول ۳ ثبت شده است. مبنای نیمه‌مقاوم و حساس بودن جدایه‌ها براساس قطر هاله بازدارنده بود، به‌طوری‌که جدایه‌هایی با قطر هاله بازدارنده بین ۶-۱ میلی‌متر در گروه نیمه مقاوم و جدایه‌هایی که قطر هاله آن‌ها بیشتر از ۶ میلی‌متر بود در گروه حساس طبقه‌بندی شدند.

خصوصیات ژنوتیپی

ردیابی *Xaj* عامل بلایت گردو با آغازگرهای اختصاصی

جدایه‌های نماینده تکثیر شده با آغازگر اختصاصی rev_seq، که براساس خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری‌شناسی به‌عنوان *Xaj* تشخیص داده شده بودند، در واکنش PCR قطعه قابل انتظار ۴۱۳ جفت بازی را تولید کردند (شکل ۲).

rep-PCR -۲-۴-۴

۲۶ جدایه زانتوموناس عامل بلایت گردو در آزمون rep-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات بین نواحی حفاظت شده با آغازگرهای ERIC، Box و Rep به‌ترتیب در شکل‌های ۳-۱، ۳-۲ و ۳-۳ نشان داده شده است.

با استفاده از نتایج حاصل از الکتروفورز محصول آغازگرهای واکنش rep-PCR، دندروگرام مربوط به جدایه‌های *Xaj* با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (j) رسم گردید. بر این اساس جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۴ درصد به دو گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۴)؛ که گروه اول شامل جدایه‌های A_2، A_4، K_1، K_2، B_1، B_2، N1، N2، D_1، D_2، ZA، E_1، E_3، Be، Ba_1، Ba_2، Ba_3، Ba_4، Gh، S_1 و S_2 و گروه دوم شامل A_3، K_3، N_3 و IT بودند.

بحث

در این تحقیق خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی جدایه‌های عامل بلایت گردو مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت که از درختان گردو دارای علائم جداسازی شدند، براساس آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی مانند ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، تولید H_2S از سیستئین، رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، عدم تولید رنگ فلورسنت روی محیط‌کشت KB، عدم پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط‌کشت EMB، تولید پرگنه‌های لعابی و گنبدی روی محیط‌کشت‌های NAS و SPA و استفاده از قندها و اسیدآمینه‌های گلوکز، سوکروز، سلوبیوز، دی‌ریبوز، دی‌مانوز، ال‌سرین، ال‌آرابینوز، ال‌آسپارژین، دی‌ملی‌بیوز، ال‌آرابیتول و عدم استفاده از دی‌سوربیتول، ال‌رامنوز، دی‌مانیتول، ال والین، ال هیستیدین، دی‌آلانین، ال ایزولوسین و دی‌آلانین به‌عنوان پتووار *Xaj* تشخیص داده شدند، *گاردان* و همکاران؛ *شاد* و همکاران (Gardan *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

2000; Sahaad *et al*., 2001).

نتایج آزمون‌های فنوتیپی نشان داد که کلیه سویه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی نسبتاً یکنواخت بوده و تنها در مواردی، اختلافات اندک در خصوصیات تغذیه‌ای و بیوشیمیایی آن‌ها مشاهده گردید که نتایج این تحقیق با نتایج گل‌محمدی و همکاران مشابهت داشت. از نظر آزمون فنوتیپی جدایه K_3 در هیدرولیز نشاسته و استفاده از قند ال-آلانین با جدایه‌های دیگر تفاوت داشت. همچنین جدایه IT در استفاده از قند ال-آلانین و تحمل نمک طعام نسبت به جدایه‌های دیگر متفاوت بود.

در آزمون حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تقریباً حساسیت و مقاومت اکثر جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشابه بود که می‌تواند ناشی از عدم‌استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه عدم ایجاد فشار انتخاب در کنترل بیماری مذکور باشد. آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، کانامایسین، نورفلوکساسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین دارای بیشترین اثر بازدارندگی بودند که می‌توان در صورت مقرون به صرفه بودن آن‌ها از لحاظ اقتصادی، با مدیریت صحیح در تناوب با سموم مسی استفاده گردند.

آزمون اثبات بیماری‌زایی روی نهال و میوه گردو انجام شد که برای طبقه‌بندی پتووارهای باکتریایی بیمارگر از اهمیت بالایی برخوردار است، چون این طبقه‌بندی براساس بیماری‌زایی روی یک میزبان یا گروهی از میزبان‌های خاص می‌باشد. در عین حال خصوصیت بیماری‌زایی به‌عنوان یک فنوتیپ مشخص به تنهایی برای تفکیک و تمایز پتووارها کافی نیست و تحقیقات مختلف روی پتووارهای دیگر گونه‌های زانتوموناس از قبیل *X. citri* نشان داد، که تنوع ژنتیکی درون پتووارها وجود دارد، *نگوک* و همکاران (Ngoc *et al*., 2010).

rep-PCR از دیگر تکنیک‌های ایجاد اثر انگشت ژنتیکی و بررسی تنوع در میان جمعیت‌ها است، که نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر، سریع‌تر و مناسب‌تر است، *لووس* و همکاران (Louws *et al*., 1994). همچنین براساس آنالیز داده‌های REP-PCR، جدایه‌های جمع‌آوری شده به دو گروه اصلی تقسیم شدند، که با نتایج حاصل از خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تطابق داشت. همچنین گروه‌بندی انجام شده توسط آغازگرهای BOX، ERIC و REP توانست به‌خوبی تنوع را بین جدایه‌های مورد بررسی نشان دهد، که با نتایج اسکورتیچینی و همکاران (2001) مطابقت داشت. طبق این تحقیق مشخص شد، این تکنیک برای تفکیک استرین‌های مختلف پتووار *Xaj* مناسب می‌باشد. البته بسیاری از تحقیقات دیگر که در زمینه بررسی تنوع درون استرین‌های دیگر پتووار باکتریایی انجام شده بود، نیز مشخص کرده بود، که این تکنیک برای بررسی تنوع در حد پتووار کارآ است. تنوع موجود در بین جدایه‌های این بیمارگر را می‌توان به تنوع در ژرم‌پلاسم گردو و منشاء جغرافیایی مختلف نسبت داد. به‌طورکلی میان اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها در روش rep-PCR با منطقه نمونه‌برداری (شهرستان‌های استان فارس و لرستان) ارتباط خاصی مشاهده نشد و استفاده از این آغازگرها نتوانستند جدایه‌ها را از نظر منشاء جغرافیایی تفکیک نماید.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۳-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir