ردیابی عوامل پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه سیب‌زمینی در استان اصفهان*

Detection of the causal agents of potato soft rot and blackleg in Isfahan province

راضیه فیروز، مسعود بهار ** **و بهرام شریف نبی**

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت ۸۵/۱۱/۸ پذیرش ۸۶/۸/۲

چکیده

به منظور ردیابی و شناسایی عوامل پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه سیب‌زمینی در استان اصفهان، طی سال‌های ۸۳- ۸۲ از غده و ساقه‌های سیب‌زمینی دارای علائم پوسیدگی نرم همراه با سیاه شدگی بافت نمونه‌برداری شد و تعداد ۵۴ جدایه باکتریایی به دست آمد. بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و نیز فعالیت پکتولیتیکی، ۴۳ جدایه به عنوان(*Dch*) *Dickeya chrysanthemi* شناخته شدند. تعداد ۱۱ جدایه دیگر به لحاظ بعضی خصوصیات متفاوت بیوشیمیایی به‌عنوان زیر گونه(*Pcc*) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* شناسایی گردیدند، ولی هیچ کدام از آنها (*Pa*) *P. atrosepticum* تشخیص داده نشد. صحت نتایج بدست آمده در شناسایی عوامل بیمارگر با بکار گیری جفت آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز تأیید گردید. در ادامه بررسی، با استفاده از آغازگر عمومی G1/L1 نواحی ITS جدایه‌ها تکثیر شد و بر اساس الگوی باندی تولید شده، این جدایه ها در سه گروه قرار گرفتند.گروه اول ITS-PCR فقط یک جدایه استاندارد (EcaSCRI1043) را در برگرفت. جدایه‌هایی که بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی *Pcc* معرفی شدند، در گروه دوم ITS-PCR قرار گرفتند و جدایه‌های *Dch*، گروه

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه صنعتی اصفهان

** مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

سوم ITS-PCR را تشکیل دادندکه تفکیک این گروهها با انجام آزمون ITS- RFLP نیز تأیید شد. بر اساس نتایج این بررسی، *Dch* و*Pcc* به ترتیب بیمارگرهای غالب ایجاد کننده ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در اصفهان شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: *Pectobacterium*، *Dickeya*، پوسیدگی نرم سیب‌زمینی، ساق‌سیاه سیب‌زمینی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

گونه و زیرگونه‌های *Pectobacterium* متعلق به خانواده Entrobacteriaceae از جمله بیمارگرهای مهم باکتریایی محسوب می‌شوند که در تعداد زیادی از گیاهان پوسیدگی نرم ایجاد می‌کنند. از مهمترین پکتوباکتریومهای مولد پوسیدگی نرم سه باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ،*Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) (van Hall) Gardan *Dickeya*. *chrysanthemi* (*Dch*) (Burkholder) Brenner *et al.* و (*Pcc*) (Jones) Hauben *et al.* هستند که در سیب‌زمینی بیماری ایجاد می‌کنند (Perombelon & Salmond 1995). به طور معمول *Pa* موجب بیماری ساق‌سیاه (blackleg) در سیب‌زمینی می گردد که آلودگی از غده بذری نشأت می‌گیرد. در اکثر کشورهای جهان، از جمله ایران، حداکثر آلودگی مجاز به این بیماری در مزارع تولید بذر مادری سیب‌زمینی کمتر از یک در هزار در نظر گرفته می‌شود (www.**nak.nl**/documents). در مقابل، علیرغم خسارت وارده در نتیجه لهیدگی سیب‌زمینی بر اثر فعالیت باکتری‌های*Pcc* و *Dch* در محل زخم‌های گیاه در طوقه و یا ساقه، هنوز برای حضور آنها در مزرعه از نظر درجه‌بندی بذر سیب‌زمینی محدودیت خاصی اعمال نمی‌شود. اگرچه سیاه شدن بافت ساقه و غده سیب‌زمینی از جمله مشخصات اصلی بیماری ساق‌سیاه در اثر حمله *Pa* می باشد(Harrison & Niellsen 1981)، ولی تحت شرایط هوای گرم مزرعه، ممکن است باکتری‌های *Pcc* و *Dch* نیز چنین علائمی را ایجاد نمایند (Molina & Harrison 1977). در ایالت اورگان امریکا، در اوایل فصل که آب و هوای سردی وجود دارد *Pa* بیمارگر اصلی ساق سیاه سیب‌زمینی محسوب می‌گردد، ولی در اواخر فصل که دما بالاتر است *Pcc* به صورت بیمارگر غالب در می‌آید (Powelson 1980). همچنین *Pcc* در

Archive of SID

www.SID.ir

کلرادو (Molina & Horrison 1977) و آریزونا (Staghellini & Meneley 1975) به عنوان متداولترین عامل بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی گزارش شده است. در اسرائیل *Dch* عامل اصلی ساق سیاه سیب‌زمینی می‌باشد (Lumb *et al*. 1986) و در ایالت Rio Grande do sul (Rs) برزیل عوامل ایجاد کننده ساق سیاه سیب‌زمینی *Pa* (۵۵٪)، *Pcc* (۴۵٪) و *Dch* (۱٪) اعلام شده‌اند (Oliveria *et al*. 2003). این مشابهت علائم بوجود آمده بر اثر *Pa* با *Pcc* و یا *Dch* باعث می‌شود که براساس مشخصات ظاهری بوته مریض، عامل بیماری *Pa* حدس زده شود که متعاقباً در درجه بندی سیب‌زمینی‌های بذری اشکال به وجود می‌آورد.

شناسایی و تفکیک پکتوباکتریوم‌های مولد ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم بر پایه تفاوت در خصوصیات بیماریزایی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن‌ها (Schaad *et al*. 2001) و نیز تفاوت دمایی لازم برای رشد در محیط کشت Crystal Violet Pectate (CVP) (Cupple& Kelman 1974) مرسوم می‌باشد.گزارش اولیه حضور *Pa* در اصفهان (Bahar & Danesh 1985) و نیز شناسایی عوامل ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم در مزارع کشور (Soheyli-Moghadam & Hassanzadeh 2004, Zohoor *et al*. 1998) نیز بر مبنای آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی صورت گرفته است. با وجودآنکه این خصوصیات قابل اعتماد هستند، ولی لزوم تهیه محیط‌های کشت مختلف و زمان طولانی برای ثبت نتایج بدست آمده از آزمایش‌های بیوشیمیایی، ردیابی و تفکیک سریع و دقیق عامل بیماری را با مشکل مواجه می‌سازد. استفاده از روش‌های سرولوژیکی (DeBoer & Naughton 1987, DeBoer *et al*. 1979) نیز به دلیل ناهمگنی سرولوژیکی و وجود واکنش‌های تقاطعی درون گونه‌ای جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف، مانع مهمی برای تشخیص دقیق پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم سیب‌زمینی است. تهیه کاوشگر (probe) اختصاصی برای شناسایی جدایه‌های *Pa* و *Pcc* با استفاده از هیبریداسیون DNA، روشی سریع برای تشخیص این باکتری‌ها عنوان شده است و حتی جمعیت اندکی از آن‌ها را در غده ردیابی می‌کند (Ward &. DeBoer. 1990; Ward &. DeBoer 1994)، ولی پیچیدگی روش ، نیاز به تجهیزات زیاد وهزینه نسبتاً بالا، کاربرد این روش را محدود ساخته است (Darrase *et al*. 1994).

در سال‌های اخیر استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Archive of SID

www.SID.ir

(Polymerase Chain Reaction, PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قسمتی از ژنوم بیمارگر مورد توجه قرار گرفته است. این روش ساده، سریع، حساس و اختصاصی بوده وبه دلیل هزینه کم، به طور وسیعی جهت شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بکار می‌رود (Darrasse *et al*. 1994, De Boer & Ward 1995, Nassar e*t al*. 1996, Kang *et al*. 2003). در این رابطه آغازگرهای مختلفی برای تفکیک گونه‌ها و زیرگونه‌های پکتوباکتریوم تعریف شده‌اندکه هدف اصلی استفاده از آنها، شناسایی و ردیابی عوامل ایجاد کننده بیماری‌های ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی می‌باشد. در بین آغازگرهای مورد استفاده در PCR، جفت آغازگر Y1/Y2 بر پایه توالی نوکلئوتیدی ژن پکتات لیاز پکتوباکتریوم‌ها طراحی شده است که جهت شناسایی *Pc* و *Pa* استفاده می‌گردد (Darrasse *etal*. 1994). برای شناسایی و ردیابی اختصاصی *Pa* در سیب‌زمینی، جفت آغازگر اختصاصی Eca1f/Eca2r پیشنهاد شده است که با این جفت آغازگر، DNA زیرگونه‌های *P.carotovora* و نیز *D. chrysanthemi* تکثیر نمی‌شوند. اختصاصی بودن و حساسیت این آغازگر در ردیابی و شناسایی تمام گروه‌های سرولوژیکی *Pa* در غده‌های آلوده نسبت به روش‌های سرولوژیک نظیر الایزا بیشتر می‌باشد (De Boer & Ward 1995). جفت آغازگر ADE1/ADE2 که براساس ناحیه حفاظت شده کلاستر ADE *pel*، ژنهای اختصاصی برای بیماریزایی *Dch*، طراحی شده است، بطور اختصاصی استرین‌های بیماریزای *Dch* را شناسایی می‌کند (Nassar e*t* al. 1996) . در تحقیقات دیگر بر پایه توالی نوکلئوتیدی URP-PCR باکتری *Pcc*، در ابتدا کاوشگر وسپس جفت آغازگر ExpccF/ExpccR جهت شناسایی *Pcc* معرفی گردید که با استفاده از این جفت آغازگر می‌توان تمام جدایه‌های *Pcc* را شناسایی نمود (Kang *et al*. 2003).

تمام آغازگرهای مورد اشاره، اختصاصی بوده و برای تکثیر انحصاری یکی از عوامل بیمارگر *Dch*، *Pa* و *Pcc* پیشنهاد شده‌اند. به این ترتیب برای تعیین دخالت هرکدام از این باکتریها نیاز به انجام سه واکنش مختلف PCR می‌باشد تا مشخص گردد کدام عامل و یا عوامل در بروز ساق‌سیاه و یا پوسیدگی نرم سیب‌زمینی دخالت دارند که برای دستیابی به نتیجه، هزینه و زمان زیادی لازم است.به این ترتیب دسترسی به یک آغازگر عمومی که بتواند بطور همزمان هر سه عامل بیمارگر *Dch* ، *Pa* و *Pcc* را با دقت مناسب تکثیر نموده و براساس الگوی باندی از

Archive of SID

www.SID.ir

هم تفکیک کند، به لحاظ سرعت عمل و کاهش هزینه آزمایشات، اهمیت زیادی دارد. با استفاده ازآغازگر عمومی G1/L1 که بر پایه نواحی 16S – 23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) جهت شناسایی پروکاریوت‌ها طراحی شده است(Jensen *et al*. 1993) می توان با انجام یک واکنش PCR، باکتری‌های *Pcc*، *Dch* و *Pa* را بر اساس الگوهای باندی تولید شده از هم تفکیک نمود و آن‌ها را از سایر عوامل پوسیدگی نرم نیز تشخیص داد. در این موارد تأئید شناسایی با استفاده از آنالیز RFLP بر روی محصول PCR صورت می‌گیرد (Toth *et al*. 2001). در این بررسی سعی شد کارایی استفاده از آغازگر G1/L1 در واکنش PCR برای شناسایی و تفکیک عوامل بیمارگر ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مقایسه با آغازگرهای دیگر و همچنین روش‌های بیوشیمیایی در شرایط منطقه اصفهان ارزیابی گردد.

روش بررسی

الف- جداسازی، نگهداری و انجام آزمونهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

طی ماه‌های مرداد ۱۳۸۲ و شهریور ۱۳۸۳، مزارع سیب‌زمینی واقع در مناطق مختلف استان اصفهان (فریدن، چادگان، نجف آباد، سمیرم، درچه و فلاورجان) مورد بازدید قرار گرفتند. ارقام سیب‌زمینی مورد کشت در این مزارع دیامونت (فریدن، چادگان، درچه)، مارفونا (سمیرم، چادگان) و سانته (نجف آباد، فلاورجان) بودند. در هر کدام از مزارع چندین بوته که علائم بیماری پوسیدگی نرم همراه با سیاه شدن غده و ساق سیاه را نشان می‌دادند، انتخاب شدند و غده‌ها و ساقه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل گردیدند. به منظور جداسازی عوامل بیماری، ساقه‌ها و غده‌های لهیده با جریان آب معمولی شسته شدند. سپس قطعاتی از مرز بافت‌های سالم و آلوده جدا گردید و پس از ضدعفونی ۴۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ٪۵/. (مایع تجارتی سفید کننده ٪۱۰) و شستشو با آب مقطرسترون، قطعات مزبور به طور جداگانه به لوله‌های حاوی پنج میلی‌لیتر آب مقطرسترون منتقل شدند. پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه، از سوسپانسیون به دست آمده، یک لوپ روی محیط کشت EMB (eosin methylen blue) به روش خطی کشت گردید. در بعضی موارد لوپ سترون به حاشیه بخش لهیده سیب‌زمینی آلوده شد ومایع بافت لهیده به طور مستقیم روی محیط کشت EMB مخطط گشت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷°C نگهداری شدند و پس از ۴۸ ساعت از هر تشتک چند پرگنه با

Archive of SID

www.SID.ir

درخشندگی سبز متالیک انتخاب شده و برای خالص‌سازی، مجدداً روی محیط EMB به صورت مخطط کشت گردید. برای تکثیر جدایه‌ها از محیط آگار غذایی nutrient agar (NA) استفاده شد.

بعد از خالص‌سازی، یک لوپ از پرگنه‌های هر جدایه باکتری به لوله‌های حاوی محیط کشت nutrient broth (NB) اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت رشد روی دستگاه لرزاننده در آزمایشگاه، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه به طور جداگانه با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسیرین استریل مخلوط شد و پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع، به فریزر ۸۰°C- منتقل گردید تا در آزمایشات بعدی استفاده شود. جدایه‌های استاندارد (*Pa*) EcaSCRI1043، EccSCRI193 (*Pcc*) و (*Dch*) EchSCRI3739 (اهدایی Dr.Toth، موسسه تحقیقات زراعی Dundee- اسکاتلند) و نیز جدایه (*Pa*) Ecash (اهدایی دکتر تقوی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شیراز) نیز به عنوان شاهد در بررسیهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

توانایی بیماریزایی جدایه‌های بدست آمده با مایه‌زنی یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه در NA، بر روی ورقه‌های سیب‌زمینی داخل پتری و یا حفره‌های تعبیه شده در غده‌های سیب‌زمینی ضدعفونی سطحی شده با هیپوکلریت سدیم ٪۵/. و الکل ٪۹۵ ارزیابی گردید. همچنین، یک جدایه مشخص از هر منطقه نمونه‌برداری شده به همراه جدایه‌های استاندارد بر روی بوته‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شد. به این منظور حدود نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون۲۴ ساعت رشد یافته هر جدایه در محیط NB ، با چگالی نوری (optical density) ۱۲/.-۱/. واحد OD در طول موج ۶۰۰ نانو متر، در قسمت بالای طوقه بوته‌های دو ماه رشد کرده سیب‌زمینی رقم اگریا تزریق شد. برای مایه‌زنی گیاهان شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید.

آزمون‌های مربوط به تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های پکتوباکتریوم به دست آمده، بر اساس روش‌های معمول در باکتری شناسی گیاهی (De Boer & Kelman 2001; Schaad *et al*. 2001) انجام گرفت.

ب- استخراج DNA

استخراج DNA جدایه‌ها به روش cetyl trimethyl amonium bromide (CTAB) (Cullen *et al*. 2001) انجام شد. به این منظور سه میلی لیتر از سوسپانسیون ٢٤ ساعت رشد کرده باکتری در محیط غذایی NB رسوب داده شد. رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج شامل: ۱۰/٦۸۵ گرم K_2HPO_4 ، ۱۰ گرم CTAB ، ٤۳/۸۳ گرم NaCl و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطرسترون به صورت سوسپانسیون در آمده و به مدت ۱۵ دقیقه در $^{\circ}C$ ٦۵ نگهداری شد. سلول‌های باکتری در ٦۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد و فاز رویی به لوله‌های جدید منتقل گردید. سپس هم حجم فاز مایع، مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲٤:۱) به هر نمونه اضافه شد و سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف RNA، سه میکرولیتر از RNase-A (Sigma) به هرنمونه اضافه گردید و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار گرفت. در مرحله بعد، هم حجم فا ز رویی ایزوپروپانول سرد و ۱/ ۰ حجم استات سدیم ۳ مولار (pH ۵/۲) جهت رسوب دادن DNA به هر نمونه اضافه شد و در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب DNA حاصل پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد در معرض هوا خشک شده و سپس در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون حل گردید و به فریزر $^{\circ}C$ ۲۰- منتقل شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش‌های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز پنج میکرولیتر از DNA بدست آمده در ژل آگارز ۷/. در بافر TAE و مقایسه تراکم باند آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III (*λ*-DNA- *Eco*RI / *Hind*III) استفاده شد.

ج -انجام واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی

آغازگرهای ADE1/ ADE2، Expccf/ ExpccR و Eca1f/ Eca2r که به ترتیب برای شناسایی *Dch* (Nassar e*t al*. 1996)، *Pcc* (Kang *et al*. 2003) و *Pa* (De Boer & Ward 1995) معرفی شده‌اند، برای تکثیر قسمتی از ژنوم جدایه‌های مورد بررسی به کار رفتند. به این منظور در هر لوله نیم میلی لیتری دو میکرولیتر از DNA (۵۰ – ۲۵ ng/µl) با ۲۵۰ میکرو مولار از مخلوط dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر جفت آغازگر، یک واحد آنزیم تک پلیمراز (*Taq* DNA polymerase) و ۱/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X PCR مخلوط شدند. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی سترون، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Genius FGEN 05TD) قرارگرفتند. مواد شیمیایی و آنزیمی از شرکت Roch (مانهیم–آلمان) تهیه شد و آغازگرها نیز توسط شرکت TIB(برلین–آلمان) سنتز گردیدند.

شرایط PCR برای تکثیر نمونه‌ها به صورت یک چرخه پنج دقیقه‌ای واسرشت اولیه

Archive of SID

www.SID.ir

(denaturing) در°C۹۵، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت در°C ۹۵به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (annealing) در C ° ٦۰ به مدت ٤٥ ثانیه و گسترش (extension) در C ° ۷۲ به مدت ٤٥ ثانیه انجام یافت و در پایان، یک چرخه گسترش نهایی در C ° ۷۲به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در مورد آغازگر ADE1/ADE2، دمای اتصال و دمای گسترش مشابه یکدیگر (C ° ۷۲) و هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه برنامه‌ریزی شد. بعد از انجام واکنش، هفت میکرولیتر از محصول PCR با سه میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE (Tris-borate-EDTA) با شدت جریان ۶۸ میلی آمپر الکتروفورزگردید. پس از انجام رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید (µg/ml ۰/۵)، مشاهده باندها در زیر اشعه ماوراء بنفش (۲۵۴ نانومتر، UV) و عکسبرداری با دستگاه Photoducument صورت گرفت.

د- انجام واکنش PCR و هضم آنزیمی ناحیه ITS

به منظور شناسایی سریع و تفکیک همزمان جدایه‌ها، آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر G1/L1 (Jensen *et al*. 1993) و با مواد تشکیل دهنده آمیزه قبلی انجام گرفت، با این تفاوت که ۱/۵ میکرولیتر dimethyl sulfoxide (DMSO) و ۰/۲۴ میکرولیتر(BSA) bovin serum albumin 10 mg/ml به هر واکنش اضافه شد. شرایط واکنش PCR با این جفت آغازگر مطابق برنامه توصیه شده (Jensen *et al*. 1993) به صورت یک چرخه یک دقیقه‌ای واسرشت اولیه در °C۹۵، سپس ۲۵ چرخه شامل واسرشت در C ° ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در C ° ۵۵ به مدت پنج دقیقه و گسترش درC ° ۷۲ به مدت دو دقیقه انجام یافت و در پایان یک چرخه گسترش نهایی درC ° ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام واکنش، محصولات PCR به دست آمده با آنزیم‌های محدودگر *Cfo*I و *Rsa*I برش یافتند. واکنش برش آنزیمی ۱۵ میکرو لیتری شامل ۱۰ میکرولیتر DNA تکثیر شده، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10Xمناسب برای آنزیم، یک میکرولیتر آنزیم برشی و ۲/۵ میکرولیترآب مقطر سترون بود که پس از مخلوط کردن کامل به مدت سه ساعت در دمای C ° ۳۷ قرار داده شد. تعداد و اندازه باندهای تولید شده در هر برش آنزیمی در ژل آگارز ٪۲ در بافر TBE و با استفاده از نشانگر Ladder ۵۰ ارزیابی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه

از غده و ساقه‌های سیب‌زمینی که دارای علائم پوسیدگی نرم همراه با سیاه شدن بودند، تعداد ۵۴ جدایه باکتری به دست آمد (جدول ۱). یک هفته پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در ساقه‌های سیب‌زمینی کشت شده در گلخانه علایم ساق سیاه مشابه علایم مزرعه مشاهده شد که از کشت مجدد برخی ازآنها روی محیط EMB پرگنه‌های سبز متالیک مشابه با جدایه‌های مایه‌زنی شده بدست آمد. ساقه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطرسترون هیچگونه علایمی را نشان ندادند. جدایه‌ها براساس ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و نیز فعالیت پکتولتیکی متعلق به جنس‌های *Dickeya* و *Pectobacterium* تشخیص داده شدند (جدول۲). اختلاف نتایج فسفاتاز، تولید ایندول و عدم تولید مواد احیاء کننده از ساکارز، رشد در$37^{\circ}C$ و نیز تولید اسید از تری‌هالوز و آلفامتیل گلوکزاید جدایه‌ها و مقایسه آن‌ها با جدایه‌های استاندارد EcaSCRI1043، EccSCRI193 و EchSCRI3739 مشخص نمود که جدایه‌های منطقه اصفهان در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه اول که ۴۳ جدایه را شامل می‌شدند به دلیل واکنش مثبت فسفاتاز، عدم احیای مواد از ساکارز، توانایی رشد در$37^{\circ}C$ ، تولید ایندول و همچنین تولید اسید از قندهای آرابینوز، ملی‌بیوز و لاکتوز و عدم تولید اسید از قندهای تری‌هالوز، آلفا متیل دی گلوکوزید و پالاتینوز به عنوان *Dch* شناخته شدند. تعداد ۱۱ جدایه باقیمانده به گروه دوم تعلق داشتند که از نظر بعضی خصوصیات بیوشیمیایی مانند تولید اسید از قندهای تری‌هالوز و لاکتوز و عدم استفاده از قندهای پالاتینوز و آلفا متیل دی گلوکوزید و همچنین توانایی رشد در$37^{\circ}C$ و عدم تولید فسفاتاز، ایندول و تولید مواد احیا کننده از ساکارز با زیر گونه *Pcc* شباهت کامل داشتند (جدول ۲). هیچکدام از جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات مورد بررسی به جدایه (*Pca*) EcaSCRI104 (گروه سوم) شبیه نبودند. برای روشن شدن احتمال دخالت هردو باکتری *Dch* و *Pcc* در ایجاد بیماری روی یک بوته، هشت نمونه مبتلا به ساق سیاه روی محیط EMB کشت گردید. پس از رشد ۷۲ ساعته، از هر طشتک نمونه ۱۰ پرگنه سبز متالیک بطور مجزا کشت خالص گردیده و تحت آزمایشات بیوشیمیایی قرار گرفتند. در هیچ موردی تفاوتی در بین جدایه‌های بدست آمده از یک بوته بیمار مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای حضور توأمان باکتری‌های *Dch* و *Pcc* برای تولید بیماری در یک بوته را، طی این بررسی، منتفی می‌سازد.

Archive of SID

www.SID.ir

در بررسی نتایج حاصل از واکنش PCR با آغازگر اختصاصی Eca1f/ Eca2r، قطعه مورد انتظار ٦٩٠ نوکلئوتیدی در جدایه EcaSCRI1043 تکثیر شد، ولی هیچ کدام از جدایه‌های دیگر چنین قطعه‌ای را تکثیر ننمودند (شکل۱). جفت آغازگر ADE1/ADE2 که برای شناسایی اختصاصی *Dch* معرفی شده است درEchSCRI3739 و نیز جدایه‌های گروه اول (گروه *Dch*) قطعه مورد انتظار ٤٢٠ نوکلئوتیدی را تکثیر کردند (شکل ۲). این جفت آغازگر هیچ گونه تکثیری در جدایه‌های گروه دوم و همچنین جدایه‌های استاندارد دیگر انجام نداد. حاصل واکنش PCR با آغازگر ExpccF/ExpccR تولید یک قطعه حدود۵۵۰ نوکلئوتیدی در جدایه گروه دوم (گروه *Pcc*) و همین طور جدایه EccSCRI193 بود . چنین نتیجه ای برای واکنش PCR با جدایه‌های EcaSCRI1043 و EchSCRI3739 و نیز جدایه‌های گروه اول بدست نیامد (شکل ۳).

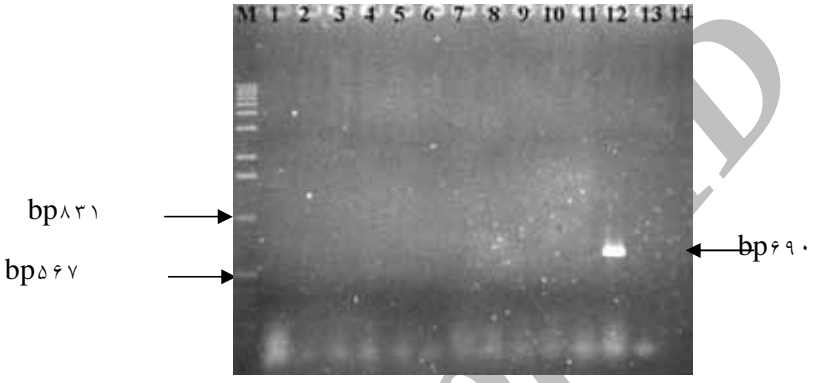
با بررسی محصول واکنش ITS-PCR جدایه‌ها با جفت آغازگر G_1/L_1 ، جدایه‌های مورد بررسی در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول فقط شامل EcaSCRI1043 بود که قطعات با اندازه تقریبی ۵۴۰، ۵۷۵، ۶۲۰ و ۷۴۰ نوکلئوتیدی را تکثیر نمود. گروه دوم ،جدایه EccSCRI193 و جدایه‌هایی را در بر گرفت که بر پایه آزمون‌های PCR ،بیوشیمیایی و فیزیولوزیکی *Pcc* طبقه بندی شده بودند. در آزمون ITS-PCR، این باکتریها قطعات حدود ۵۴۰، ۵۷۵ و ۷۴۰ نوکلئوتیدی ایجاد کردند. در نهایت EchSCRI3739 و جدایه‌هایی که طی این آزمایشات به عنوان *Dch* شناخته شدند با تکثیر قطعات حدود ۴۵۰، ۵۹۰ و ۶۹۰ نوکلئوتیدی در گروه سوم ITS-PCR قرار گرفتند (شکل۴).

جهت انجام RFLP، ازآنزیم‌های برشی محدودگر توصیه شده و متناسب با گروه‌های ITS-PCR استفاده شد. به این منظور برای تفکیک گروه اول و سوم ITS-PCR، آنزیم محدودگر برشی *Cfo*I، و برای تشخیص گروه دوم ITS PCR آنزیم برشی *Rsa*I بکار رفت. ITS-RFLP گروه اول که فقط شامل جدایه استاندارد EcaSCRI 1043 بود با آنزیم *Cfo*I قطعات مورد انتظار۱۱۵، ۱۵۳، ۲۲۵، ۳۴۵ نوکلئوتیدی را ایجاد کردند. گروه دوم ITS-RFLP که جدایه‌های متعلق به *Pcc* و EccSCRI193 را دربر می‌گرفت با آنزیم *Rsa*I قطعات حدود ۱۸۰، ۲۱۰ و ۳۵۵ نوکلئوتیدی تولید نمودند. با همین آنزیم جدایه Ecash شیراز قطعاتی تقریباً به اندازه ۱۱۵، ۱۸۰، ۲۲۵ و ۳۵۵ ایجاد کرد که نشانگر تفاوت این جدایه با جدایه‌های دیگر و از جمله جدایه

Archive of SID

www.SID.ir

استاندارد EccSCRI 193 می‌باشد. جدایه‌های $DchH_1$، $DchE_1$، $DchF_2$، $DchC_4$ و EchSCRI 3739 تحت تأثیر آنزیم *Cfo*I با ایجاد قطعات حدود ۱۱۵، ۱۴۵، ۲۵۵ و ۴۵۵ نوکلئوتیدی ، ITS-RFLP گروه سوم را تشکیل دادند (شکل۵).



شکل ۱- نتایج تکثیر با PCR جدایه‌های استاندارد *Pectobacterium*، *Dickeya* وجدایه‌های اصفهان با استفاده ازآغازگر Eca1f/Eca2r M: مارکر III، ۱: $PccA_1$، ۲: $PccB_1$، ۳: $PccB_2$، ۴: $PccC_1$، ۵: $PccE_1$، ۶: $DchA_1$، ۷: $DchB_3$ ۸ : $DchR_1$، ۹ : DchZ، ۱۰: EccSCRI193، ۱۱: Ech SCRI 3739، ۱۲: Eca SCRI 1043، ۱۳: شاهد منفی (آب مقطر).

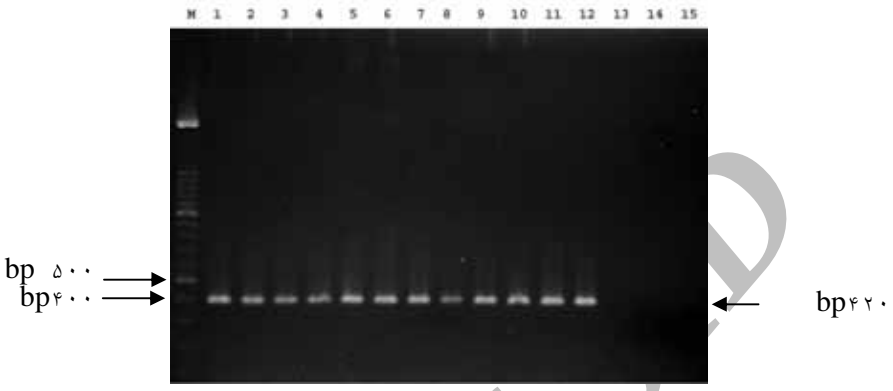
Fig. 1. Results of PCR amplification of standard isolates of *Pectobacterium*, *Dickeya* and isolates obtained from Isfahan using primer pair Eca1f/Eca2r. M: Marker III, 1: $PccA_1$, 2: $PccB_1$, 3: $PccB_2$, 4: $PccC_1$, 5: $PccE_1$, 6: $PccA_1$, 7: $DchB_3$, 8: $DchR_1$, 9: DchZ, 10: EccSCRI193, 11: EchSCRI3739, 12: Eca SCRI1043, 13:negative control (distilled water).

بحث

بدلیل اهمیت *Pa* از نظر مقررات کلاس بندی و صادرات غده بذری مادری سیب‌زمینی ونیز نادیده گرفتن آلودگی *Pcc* و*Dch* در این مقررات و با توجه به مشابهت علائم ساق سیاه بوجود آمده توسط این سه باکتری، ضروری است که برای جلوگیری از اشتباه در صدور گواهی بذری و واردات و صادرات سیب‌زمینی، تشخیص دقیق و سریع بیماری ساق‌سیاه سیب‌زمینی مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق استفاده از جفت آغازگرهای

Archive of SID

www.SID.ir



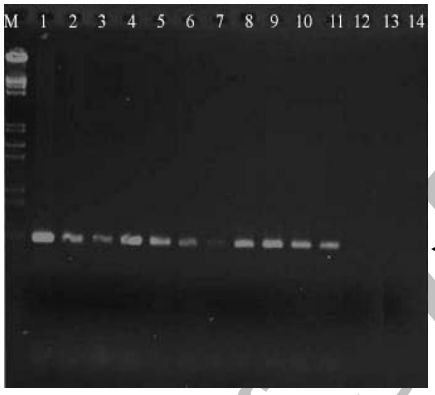
شکل ۲- تکثیر قطعه bp۴۲۰ در DNA جدایه‌های *Dch* اصفهان با استفاده از جفت آغازگر ADE1/ADE2
M: مارکر 100bp، ۱: EchSCRI3739، ۲: $DchA_1$، ۳: $DchB_2$، ۴: $DchD_3$، ۵: $DchE_2$، ۶: $DchF_3$،
۷: $DchG_2$، ۸: $DchH_3$، ۹: $DchI_2$، ۱۰: $DchM_2$، ۱۱: $DchR_1$، ۱۲: $DchZ_1$، ۱۳: EcaSCRI1043،
۱۴: EccSCRI193، ۱۵: شاهد منفی (آب مقطر).

Fig. 2. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of a 420bp DNA fragment from *Dch* isolates in Isfahan using primer pair ADE1/ADE2. M: 100bp ladder, 1: EchSCRI3739, 2: $DchA_1$, 3: $DchB_2$, 4: $DchD_3$, 5: $DchE_2$, 6: $DchF_3$, 7: $DchG_2$, 8: $DchI_2$, 9: $DchI_2$, 10: $DchM_2$, 11: $DchR_1$, 12: Dch Z_1, 13: EcaSCRI1043, 14: EccSCRI193, 15: negative control (distilled water).

ADE1/ ADE2، ExpccR/ Expccf و Eca2r /Eca1f منجر به تکثیر قطعات مورد انتظار در جدایه‌ها شد که با نتایج گروه بندی آنها بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این بررسی مطابقت کامل داشت. مجموعه نتایج بدست آمده از روش های بیوشیمیایی وPCR مشخص نمود که در سالهای نمونه‌برداری (۱۳۸۳-۱۳۸۲) باکتری *Pa* نقشی در بروز بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی در اصفهان نداشته است و بطور عمده *Dch* و در بقیه موارد *Pcc* از بوته‌ها و غده‌های بیمار جداسازی گردید. غالب بودن *Dch* در غده‌های مبتلا به ساق‌سیاه با توجه به رطوبت پایین و دمای نسبتاً بالا در مزارع منطقه اصفهان چندان هم دور از انتظار

Archive of SID

www.SID.ir



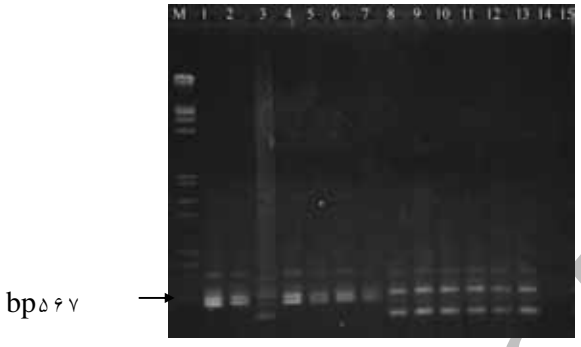
شکل۳- تولید قطعهbp ۵۵۰ در DNA جدایه‌های *Pcc* اصفهان با استفاده از آغازگر ExPccF/ExPccR.. M: مارکرIII، ۱: *Ecc*SCRI193، ۲: $PccA_1$، ۳: $PccB_1$، ۴: $PccB_3$، ۵: $PccC_1$، ۶: $PccC_2$، ۷: $PccD_1$، ۸: $PccD_2$، ۹: $PccE_1$، ۱۰: $PccE_2$، ۱۱: EchSCRI3739، ۱۲: EccSCRI193، ۱۳: شاهد منفی (آب مقطر).

Fig. 3. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of a 550bp DNA fragment from *Pcc* isolates in Isfahan using primer pair ExPccF/ExPccR M: Marker III, 1: EccSCRI193, 2: $PccA_1$, 3: $PccB_1$, 4: $PccB_3$, 5: $PccC_1$, 6: $PccC_2$, 7: $PccD_1$, 8: $PccD_2$, 9: $PccE_1$, 10: $PccE_2$, 11: EchSCRI3739 , 12: EccSCRI193, 13: negative control (distilled water).

نیست. گزارش *Dch* و به عنوان بیمارگر ساق سیاه سیب‌زمینی در اسرائیل که اقلیم خشکی دارد (Lumb *et al*. 1986) و نیز غالبیت *Pcc* در شرایط گرم مزارع سیب‌زمینی آمریکا (Powelson 1980) در مقابل اهمیت بسیار زیاد *Pa* در بروز ساق سیاه در هوای خنک و مرطوب اروپا (Molina & Horrison 1977) شواهدی برای تقویت این فرضیه محسوب می‌شوند. احتمالاً به دلیل گرم و خشک بودن شرایط اقلیمی اصفهان، *Pa* قادر نیست در مزارع سیب‌زمینی منطقه گسترش زیادی داشته باشد . در صورت قبول این فرض ، تعیین درصد آلودگی ساق سیاه به وجود آمده بر اثر *Pa* در مزارع سیب‌زمینی نیز که معمولاً به صورت مشاهده‌ای انجام می‌شود نمی‌تواند از اعتبار کافی برخوردار باشد و ضروریست برای ارزیابی وقوع ساق سیاه در مزارع

Archive of SID

www.SID.ir



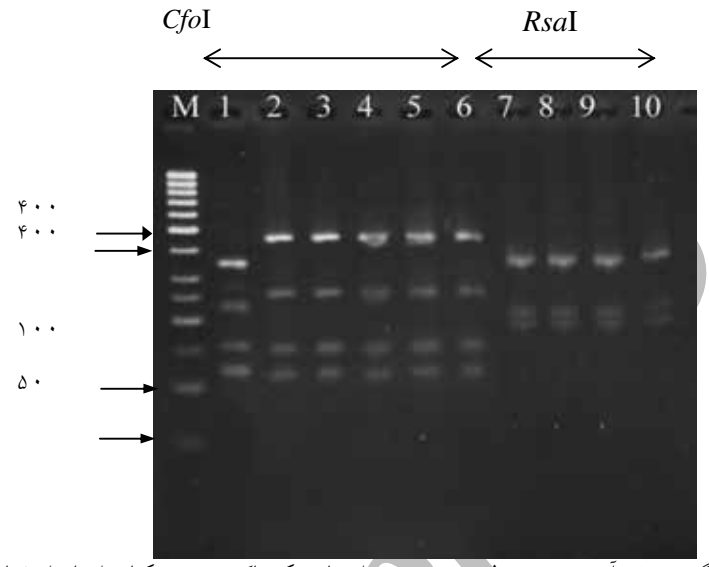
شکل۴- تکثیر قطعات DNA از ناحیه ITS با استفاده از آغازگر G_1/L_1. M: مارکرIII، ۱: EcaSCRI1043، ۲: EccSCRI193، ۳: EchSCRI3739، ۴: Ecash، ۵: $PccA_1$، ۶: PccB2، ۷: $PccC_2$، ۸: $DchA_1$، ۹: $DchB_2$، ۱۰: $DchC_4$، ۱۱: $DchF_2$، ۱۲: $DchE_1$، ۱۳: $DchH_1$، ۱۴: شاهد منفی (آب مقطر).

Fig. 4. ITS-PCR amplification patterns using primer pair G_1/l_1. M: Marker, 1: EcaSCRI1043, 2: EccSCRI193, 3: EchSCRI3739, 4: Ecash, 5: $PccA_1$, 6: $PccB_2$, 7: $PccC_2$, 8: $DchA_1$, 9: $DchB_2$, 10: $DchD_4$, 11: $DchF_2$, 12: $DchE_1$, 13: $DchH_1$, 14: negative control (distilled water.)

جهت صدورگواهی بذری آزمایشات تکمیلی نیز صورت گیرد. علیرغم مطابقت نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی با نتایج واکنش‌های PCR در این بررسی، به دلیل سهولت استفاده از روش PCR ، به کار گیری آغازگرهای مناسب اولویت بیشتری دارد. گر چه هر سه آغازگر Eca1f/ Eca2r ، ExpccF/ExpccR و ADE1/ADE2 با دقت مناسب باکتریهای *Pa*، *Pcc* ، *Dch* را از همدیگر متمایز کردند، ولی برای اجتناب از انجام سه واکنش مختلف PCR برای اطمینان از تشخیص دقیق عامل بیماری ساق‌سیاه در نمونه های ناشناخته جمع‌آوری شده از مزرعه، استفاده از آغازگر G1/L1 که قادر است طی یک واکنش با الگوی باندی مختلف برای *Pa* ، *Pcc* ، *Dch* آنها را از هم تفکیک کند مناسبت بیشتری دارد. این جفت آغازگر قادر به تکثیر ناحیه ITS rRNA ۱۶S_ ۲۳S گونه های پکتوباکتریوم و احتمالاً جنس‌های دیگر باکتری در واکنش PCR می‌باشد. اما به دلیل الگوی باندی تولید شده مشخص برای *Pa* ، *Pcc* و *Dch* نه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- الگوی برش آنزیمی محصول ITS-PCR جدایه‌های پکتوباکتریوم و دیکیای استان اصفهان پس از هضم آنزیمی با *Cfo*I و *Rsa*I. M: نشانگر۵۰bpLadder، ۱: EcaSCRI1043، ۲: EchSCRI3739، ۳: $DchC_4$، ۴: $DchF_2$، ۵: $DchE_1$، ۶: DchH1، ۷: EccSCRI193، ۸: Ecash، ۹: $PccA_1$، ۱۰: $PccC_2$.

Fig. 5. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of ITS-PCR product *Pectobacterium* and *Dickeya* isolates in Isfahan province after digestion with *Cfo*I and *Rsa*I . M: 100bp Ladder, 1: EcaSCRI1043, 2: EchSCRI3739, 3: $DchD_4$, 4: $DchF_2$, 5: $DchE_1$, 6: DchH1, 7: EccSCRI193, 8: Ecash, 9: $PccA_1$, 10: $PccC_2$.

تنها تشخیص گونه‌های مزبور از سایر جنس‌های باکتریایی بلکه تفکیک این سه گونه از همدیگر با سهولت و اطمینان کافی صورت می‌گیرد (Toth *et al*. 2001).

یادآوری می‌شود الگوهای باندی تکثیر شده توسط G1/L1 در سه گروه مختلف طبقه بندی می‌گردد. گروه اول گونه *Pa* را با تکثیر قطعات حدود ۵۴۰، ۵۷۵، ۶۲۰ و ۷۴۰ نوکلئوتیدی و گونه *P. wasabiae* را با تکثیر قطعات با اندازه تقریبی ۵۴۰، ۵۷۵، ۶۲۰ و ۷۲۰ نوکلئوتیدی شامل می شود. در گروه دوم، *Pcc* و *P. carotovorum* subsp *odoriferum* با دو نوع الگوی باندی و *P. wasabiae* و *P. cacticidae* با یک نوع الگوی باندی قرار دارند. گروه سوم ITS-PCR،

Archive of SID

www.SID.ir

Dch را شامل می‌شود که با تکثیر قطعات نواحی ITS، شش نوع الگوی باندی را ایجاد می‌کند. چون اندازه قطعات تکثیر شده در هر گروه ITS-PCR بسیار به هم نزدیک می‌باشد، از این رو انجام آزمون RFLP بر روی محصول ITS-PCR توصیه می‌گردد. طبق پیشنهاد انجام شده برای گروه ITS-PCR اول وسوم آنزیم *Cfo*I و برای انجام واکنش آنزیمی گروه دوم آنزیم *Rsa*I می‌تواند برای تفکیک اعضای داخل گروه بسیار سودمند باشند (Toth *et al*. 2001). در این بررسی به کارگیری آغازگر G1/L1 و انجام آزمون RFLP روی محصول PCR با دقت کامل جدایه‌های مربوط به *Pa*، *Pcc* و *Dch* را از هم تفکیک نمود که نتایج آن با روشهای بیوشیمیایی و سایر آغازگرهای مورد استفاده مطابق بود، هر چند تفاوت اندازه قطعات جدایه Ecash (دانشگاه شیراز) با جدایه‌های استاندارد، طبقه بندی این جدایه را دچار تردید نمود. با توجه به نتایج بدست آمده می توان کاربرد جفت آغازگر G1/L1 را جهت شناسایی دقیق عامل ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مزارع پیشنهاد نمود.

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های پکتوباکتریوم و دیکیا، عوامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در اصفهان، در مقایسه با گونه‌های استاندارد *Pa* و*Dch* وزیر گونه *Pcc*

Table 2. Phenotypic characteristics of potato soft rot causing *Pectobacterium* and *Dickeya* isolates of Isfahan in comparison with standard isolates of *Pa* and *Dch* and subspecies *Pcc*

آزمون	(Test)	جدایه‌های گروه اول (Group I)	جدایه‌های گروه دوم (Group II)	جدایه EcaSCRI1043 استاندارد	جدایه EccSCRI193 استاندارد	جدایه EchSCRI3739 استاندارد
واکنش گرم	Gram reaction	–	–	–	–	–
لهانیدن سیب‌زمینی	Potato rot	+	+	+	+	+
تاژک محیطی	Peritrichous flagella	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی وهوازی	Oxidative/ Fermentative	*	*	*	*	*
کاتالاز	Catalase	+	+	+	+	+
اکسیداز	Oxidase	–	–	–	–	–

Archive of SID

www.SID.ir

Table 1. (continued) جدول ۱- (ادامه)

هیدرولیز نشاسته	Starch hydrolysis	–	–	–	–	–
فسفاتاز	Phosphatase	+	–	–	–	+
احیاء نیترات	Nitrate reduction	+	+	+	+	+
تولید لوان	Levan production	+	+	+	+	+
تولید ایندول	Indole production	+	–	–	–	+
تولید مواد احیاء کننده ازساکارز	Reducing substance from sucrose	–	–	+	–	–
رشد در ۳۷ °C	Growth at 37°C	+	+	–	+	+
تولید اسید از:	Acid production from:					
تری هالوز	Trehalose	–	+	+	+	–
سلوبیوز	Cellobiose	+	+	+	+	+
آرابینوز	Arabinose	+	+	+	+	+
سوربیتول	Sorbitol	–	–	–	–	–
فروکتوز	Fructose	+	+	+	+	+
مانیتول	Mannitol	+	+	+	+	+
دالیسیتول	Dulcitol	–	–	–	–	–
مالتوز	Maltose	+	+	+	+	+
گلوکز	Glucose	+	+	+	+	+
ملی بیوز	Melibiose	+	+	+	+	+
پالاتینوز	Pallatinose	–	–	+	–	–
آلفا متیل گلوکوزید	α-methyl glucoside	–	–	+	–	–

+: واکنش مثبت یا رشد Positive reaction or growth

-: واکنش منفی یا عدم رشد Negative reaction or no growth

* بی هوازی اختیاری Facultatively anaerobic

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (56-53) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: راضیه فیروز، دکتر مسعود بهار و دکتر بهرام شریف نبی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

Archive of SID

www.SID.ir