Archive of SID

بررسی تنوع فنوتیپی و الکتروفورزی پکتوباکتریومهای بیماریزا روی ذرت در استان مازندران*

Study on phenotypic and electrophoretic diversity of *Pectobacterium* species infecting corn in Mazandaran

رحیم احمدوند و حشمت‌اله رحیمیان**

مؤسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر کرج و دانشکده علوم کشاورزی ساری

دریافت ١٣٨٢/١٢/٦ پذیرش ١٣٨٤/١/٣١

چکیده

به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی و نقوش الکتروفورزی پکتوباکتریومهای بیماریزا روی ذرت در استان مازندران در سال‌های ١٣٧٧ و ١٣٧٨ از مزارع ذرت استان مازندران نمونه‌برداری گردید. از بافتهای آلوده، ٢٠ استرین پکتوباکتریوم جدا و خالص‌سازی گردید. در نتایج یکصد آزمون فنوتیپی انجام شده تنوع بسیار بالایی مشاهده شد. با استفاده از آنالیز عددی دندروگرام شباهتهای استرینهای جدا شده ترسیم گردید. این استرینهای در دو گروه قرار گرفتند. استرینهای گروه اول (١٢ استرین) دارای خصوصیاتی نزدیک به گونه‌های *Pectobacterium chrysanthemi*، *P. atrosepticum* و *P. betavascularum* و زیر گونه *P. c.* subsp.*odoriferum* بودند. لذا تطابق کاملی با گونه‌ها و زیر گونه‌های شناخته شده پکتوباکتریومها نداشتند. گروه دوم (٨ استرین) به بیووار ٣ گونه *P. chrysanthemi* نسبت داده شدند. نماینده استرینهای هر یک از گروهها با یکدیگر و با استرینهای استاندارد

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

(Scottish Crop Research ارسالی از *P. chrysanthemi* SCRI#4064 و UPB 066 *P . c.* subsp. *carotovorum* مقایسه شدند. نقوش الکتروفورزی آنها نیز نشان داد که تنوع قابل توجهی در بین این گروه از باکتریها وجود دارد.بنابراین، احتمال می‌رود گونه یا زیرگونه‌های جدیدی در بین آنها وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، پکتوباکتریوم، لهیدگی باکتریایی ساقه، مازندران، ایران

مقدمه

از مهمترین عوامل بیماریزایی که محصول ذرت را تهدید می‌کنند پکتوباکتریومها می‌باشند. این گروه از باکتریها نقش عمده‌ای در کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و دارای گسترش جهانی می‌باشند. یکی از خصوصیات اصلی این گروه از باکتریها تولید مقادیر زیادی از آنزیمهای پکتولیتیک می‌باشد که قدرت لهانیدن و تخریب فراوان دارند. به علاوه این باکتریها محدودیت میزبانی (host specificity) چندانی نداشته و اکثر گیاهان آبدار و گوشتی میزبان یک یا تعداد بیشتری از گونه‌ها و یا زیرگونه‌های آنها می‌باشند (Collmer & Keen 1986, Fahy & Persely 1983).

دای (Dye 1968, 1969) جنس *Erwinia* را به چهار گروه تقسیم کرد. گروه آمیلووورا (Amylovora group) شامل گونه‌های *Erwinia amylovora* ، *E. salicis* ، *E. quercina* ، *E. nigrifluens* ، *E. tracheiphila* , و *E. mallotivora* بود. وی زیرگونه‌های *Erwinia carotovora* (*E. c.*subsp. *carotovora*,. *E.c.* subsp.*atroseptica* , *E.c.* subsp. *Betavascularum, E. c.* subsp. *wasabiae* (*E. c. odorifera E.c.*subsp. و گونه‌های *E. chrysanthemi*, *E. rhapontici* و *E. cypripedii* را در گروه کروتووورا (Carotovora group) قرار داد. گروه هربیکولا (Herbicola group) شامل گونه‌های *E. milletia, E.herbicola* ، *E. stewartii* ، *E. uredovora* و *E. ananas* را در برگرفته وبالاخره گروه غیر تیپیک (Atypical group) دارای گونه *E. dissolvens* بود. همچنین *شاد* (Schaad 1988) اروینیاهای بیماریزای گیاهی را به دو گروه Amylovora (non soft rot) و Carotovora (soft rot) تقسیم کرد. *هابن* و همکاران (Hauben *et al.* 1998) بر اساس شباهت توالی نوکلئوتیدهای ١٦ S rDNA مربوط به ٢٩

www.SID.ir

Archive of SID
استرین تیپ (type strain) و نماینده اعضـاء جنسـهای *Erwinia*، *Pantoea* و *Enterobacter* و مقایسه با بقیه اعضاء خانواده Enterobacteriaceae گونه‌ها و زیرگونه‌های گروه Carotovora بجز *E. rhapontici* را در جنس *Pectobacterium* قرار دادند. لـذا نام گونه‌ها و زیرگونـه‌هـای ایـن گروه به صورت زیر تغییر یافت:

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* comb. nov. (Pcc)
P. carotovorum subsp. *atrosepticum* comb. nov. (Pca)
P. carotovorum subsp. *betavascularum* comb. nov. (Pcb)
P. carotovorum subsp. *odoriferum* comb. nov. (Pco)
P. carotovorum subsp. *wasabiae* comb. nov. (Pcw)
P. chrysanthemi (Pch)
P. cypripedii (Pcy)
P. cacticidum (Pct)

گاردان و همکاران (Gardan *et al.* 2003) با بررسی سـرولوژیکی، همولوژی DNA و ویژگیهای فنوتیپی و نیز مقایسه توالیهای16S rDNA پنج زیـــــــــــــــــــرگونه *P. carotovorum* شـامل *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*، *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*، *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* و *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* و بیوارهای *P. chrysanthemi* و گونـه‌هـای *P. cacticidum* و *Brenneria* پیشنهاد کردند که زیرگونه‌های Pca، Pcb و Pcw به گونه ارتقاء یافته و بـه ترتیـب *P. atrosepticum*، *P. betavascularum* و *P. wasabiae* نامیـده شـوند. و فقـط Pcc و Pco در سطح زیرگونه باقی بمانند. اخیراً *سامسون* و همکـاران (Samson *et al.* 2004) بـراسـاس نتـایج بررسـی فنـوتیپی، همولـوژی DNA ومقایسـه توالـــــی ژن ١٦S r RNA پیشـنهاد کـرده‌انـد *P. chrysanthemi* و بیووارهای آن و نیز *B. paradisiaca* به جنس جدید *Dickeya* منتقل شـوند. گزارش آنها علیرغم گذشت بیش از یک سال از انتشار در اینترنت(online) هنوز به‌طور رسمی پذیرفته نشده است.

گونه *P. atrosepticum* عامل ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی، *P. betavascularum* بـه عنوان عامـل نکـروز چغنـدر قنـد، *P. chrysanthemi* بـه عنـوان عامـل پوسـیدگی سـاقه ذرت پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی و طیف وسیعی از گیاهان دیگر بوده و زیرگونه Pcc بـه عنوان عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی و پوسیدگی‌نرم و لکه برگی طیف وسیعی از محصولات زراعـی، بـاغی و زینتـی مـی‌باشـد (Bradbury 1986, Fahy& Persley 1983). گونـه

www.SID.ir

Archive of SID
P. wasabiae عامل پوسیدگی ریزوم گیاه *Eutrema wasabiae* در ژاپن (Goto & Matsomoto 1987)، زیرگونه Pco عامل پوسیدگی نرم ریواس (Gallois *et al.* 1992)، Pcy عامل پوسیدگی قهوه‌ای ارکیده (Brabury 1986) و Pct عامل پوسیدگی ساقه کاکتوس در آمریکا (Alkorn *et al.* 1991) است.

گونه *P. chrysanthemi* دارای شش پاتوار بوده و همچنین بر اساس نه آزمون بیوشیمیایی به نه بیووار تقسیم شده است (Jans & Ruissen 1988, Ngwira & Samson 1990, Samson *et al.* 1989).

بیماری لهیدگی باکتریایی ساقه ذرت (Bacterial stalk rot) اولین بار در سال ۱۹۳۰ توسط پراساد (Prasad) گزارش شد (Abdullah 1982). این بیماری در بسیاری از نقاط دنیا گزارش شده و در بعضی موارد خسارتهای زیادی به این محصول وارد کرده است (Graham 1974). علایم این بیماری معمولاً در اواسط فصل رویش گیاه ظاهر شده ولی ممکن است در گیاهچه‌ها و یا گیاهان مسن هم مشاهده شود. در بالای سطح خاک یک یا چند گره نرم و لعابدار شده و به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید (شکل ۱). ممکن است در اثر شدت بیماری، ساقه از محل آلودگی شکسته شده و بیفتد (Hooker 1981, Singh 1990). تعداد معدودی از استرینهای *P. chrysanthemi* به ذرت حمله کرده و باعث ایجاد لهیدگی باکتریایی ساقه می‌شوند که در شرایط مساعد خسارتهای عمده‌ای به این محصول وارد کند. در ایران گزارشهایی از گونه‌ها و زیر گونه‌های این گروه از باکتریها وجود دارد (Amani 1967, Izadpanah & Masoumi 1988, Banapour & Amani 1986, Bahar & Danesh 1986, Feridooni 1994, Hasanzadeh 1990, 1995, Hejarood 1967, Arab & Rahimian 1989, Zohourperalak 1998) و در بعضی موارد خصوصیات باکتریهای شناسایی شده تطابق کاملی با جداول افتراقی گونه‌ها و زیرگونه‌های شناخته شده نداشته و به نظر می‌رسد استرینهای این گونه‌ها و زیر گونه‌ها تنوع زیادی در ایران داشته باشند (رحیمیان منتشر نشده).

این بیماری در ایران، اولین بار در سال ۱۳٦۵ توسط بناپور و امانی از دشت ناز ساری (Banapour & Amani 1986) و سپس در سال ۱۳٦۷ توسط ایزدپناه و معصومی از شیراز گزارش شد (Izadpanah & Masoumi 1988). هر دو گروه محققین یاد شده باکتری عامل بیماری را *E. chrysanthemi* گزارش نمودند، ولی معدودی از خصوصیات آن را تعیین کردند که در همان

www.SID.ir

Archive of SID

ویژگیها هم بین استرینها تفاوتهایی وجود داشت.

شکل ۱- علائم بیماری لهیدگی باکتریایی ساقه ذرت.

Fig. 1. Symptom of bacterial soft rot on corn stem.

مناطق عمده کشت ذرت در استان مازندران شامل شهرهای ساری، قائمشهر، بهشهر و بابل می‌باشد. یکی از بیماریهایی که باعث کاهش این محصول می شود ، لهیدگی باکتریایی ساقه می‌باشد. بطوریکه در سال زراعی ۷۷-۷٦ حدود ۱۰-۵ درصد بوته‌های ذرت را در حومه ساری از بین برده است (رحیمیان منتشر نشده).

لذا جهت شناسایی دقیق گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف خسارتزا روی این محصول،

www.SID.ir

Archive of SID
استرینهایی از این باکتریها از منطقه مذکور جداسازی شده و خصوصیات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی و بیماریزایی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

طی بازدیدهای بعمل آمده در سالهای ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ از مزارع ذرت دشت ناز ساری تعدادی از بوته‌های دارای علائم بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی عامل بیماری، قطعات کوچکی از مرز بین بافت سالم و آلوده جدا گردیده و در تشتک پتری استریل قرار داده شد. پس از افزودن مقداری آب مقطر استریل قطعات را خرد کرده و بعد از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک قطره (Loopful) از آن توسط لوپ پلاتینی برداشته و روی محیط کشت EMB مخطط (streak) گردید. پس از دو روز نگهداری در دمای ۲۸°C ،کلنیهایی با رنگ زرد طلایی تا قرمز با درخشندگی سبز متالیک ظاهر شدند. جهت خالص‌سازی، ۳-۲ کلنی سبز متالیک از هر تشتک پتری جدا و مجدداً روی محیط EMB به صورت خطی کشت شد، سپس از هر پتری یک تک کلنی انتخاب گردیده و به عنوان یک استرین بکار برده شد. در مجموع ۲۰ استرین انتخاب و خصوصیات فنوتیپی و الکتروفورزی آنها بررسی گردید.

آزمونهای رنگ‌آمیزی گرم، تولید کاتالاز، توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید مواد احیاء کننده از سوکرز، تحمل نمک طعام ٪۳ ، ٪٤ و ٪۵، تولید گاز از گلوکز، فعالیت اوره‌آز، توانایی تولید گاز سولفید هیدروژن (H_2S) از پپتون، سیستئین و تیوسولفات سدیم، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان، اثر روی شیر لیتموس، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز اسکولین و توانایی استفاده از منابع مختلف کربنی (کربوهیدراتها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و الکلها) به روش شاد (Schaad 1988) انجام گرفت. آزمونهای فعالیت فسفاتاز، متیل رد ، تولید استوئین و تولید ۳ – کتولاکتوز به روش کوان (Cowan 1965)انجام شد. در آزمونهای توانایی احیاء نیترات به نیتریت، تولید رنگ آبی روی محیط YDC و توانایی استفاده از آسپاراژین از روش *دای* (Dye 1968) استفاده شد. آزمونهای توانایی تولید اندول و هیدرولیز کازئین شیر به روش *فهی و هیوارد* (Fahy & Hayward 1983) انجام گرفت. آزمون حلالیت در پتاس سه درصد به روش

www.SID.ir

Archive of SID
ساسلو و همکاران (Suslow *et al.* 1982) و رنگ‌آمیزی تاژک به روش *رودز* (Rodes 1958) انجام شد. آزمایش رشد هوازی و بی‌هوازی درحضور گلوکز (O/F) به روش *هیو و لایف‌سن* (Hugh & Leifson 1953) انجام شد (Hooker 1981). فعالیت اکسیداز به روش کواکس (Kovacs 1956) انجام شد. آزمون لسیتیناز به روش *لیلیوت* و همکاران (Lelliot *et al.* 1966)، آرژینین‌دی‌هیدرولاز به روش *تورنلی* (Thornley 1960) و توانایی ایجاد فوق حساسیت در توتون به روش *کلمنت* و همکاران (Klement *et al.* 1964) انجام گرفت. در انجام آزمون توانایی رشد در دماهای ۳۷ °C –۳۶ و ۴۰°C– ۳۹ از روش *شاد* (Schaad 1988) و برای ارزیابی حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیکها از روش *کلمنت* (Klement 1990) استفاده شد. توانایی هیدرولیزتوئین ۸۰ (Tween 80) به روش *میثاقی و گروگان* (Missaghi & Grogan 1969) و آزمایش دکربوکسیلاز اسیدآمینه‌های آرژینین و اورنیتین به روش *فالکو* (Falkow) انجام گرفت (Cowan & Steel 1965). جهت شناسایی بیوارهای گونه *P. chrysathemi* از توانایی رشد استرینها در دمای ۳۹ ° C، قابلیت تجزیه آرژینین در شرایط بی‌هوازی و توانایی مصرف دی-آرابینوز، اینولین، مانیتول، ملی‌بیوز، رافینوز، و دی-تارتارات به عنوان آزمونهای اصلی و از بررسی توانایی استرینها در مصرف دی-سلوبیوز، اتانل، گالات، ال-پرولین، سالیسین، ال-سرین، و ال-تارتارات به عنوان آزمونهای کمکی استفاده شد (Ngwira & Samson 1990, Samson *et al.* 1989).

جهت اثبات بیماریزایی روی ساقه ذرت، بذور ذرت توسط کربوکسین- تیرام ضدعفونی شده و در گلدانهای حاوی خاک استریل کاشته شدند. بعد از ۳ هفته یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^8 \times 2$ سلول زنده در میلی‌لیتر به گره (whorle) گیاه تزریق گردید. گیاهان در دمای ۲۸° C و رطوبت ۹۰ درصد به مدت سه روز نگهداری شدند (Smith & Burtz 1990). تیمارها دارای سه تکراربوده و از گیاهان مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

الکتروفورز پروتئینهای سلولی در ژل پلی‌اکریل‌آمید(SDS-PAGE) تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح شده *لملی* (Laemmli 1970) انجام شد.در این روش از ژل جداکننده (Separating gel) ۱۲٪ و ژل متراکم‌کننده (Stacking gel) ۵٪ استفاده گردید. رنگ‌آمیزی ژل با

www.SID.ir

Archive of SID
محلول ۰/۱ درصد کومازی بلو (Coomassi blue) در اسید استیک، متانول، آب (به ترتیب، به نسبت حجمی ۱۰ : ۵۰ : ٤۰) به مدت دو ساعت و رنگبری در حلال یاد شده (بدون رنگ) انجام و ژل در محلول ٪۷ اسید استیک نگهداری گردید (Ausuble *et al.* 1987).

با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت ویندوز دندروگرام شباهت فنوتیپی استرینهای جدا شده ترسیم گردید.

نتیجه

تمامی استرینها روی محیط کشت EMB کلنیهای گرد نامنظم گاهی با حاشیه منظم برجسته و با درخشندگی سبز متالیک تشکیل دادند (شکل۲). کلنیها روی محیط کشت NAS (nutrient agar sucrose) گرد، صاف، نسبتاً برجسته با حاشیه نامنظم و گاهی منظم و به رنگ سفید مایل به خاکستری درخشان بودند. تمام استرینها گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک با تاژکهای محیطی، بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی و قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. در آزمون فوق حساسیت ٪۵۵ استرینها مثبت بودند. از این استرینها ٪۷۰ قادر به تولید لسیتیناز بودند و ٪٦۰ آنها اندول تولید نمودند. همه استرینها آنزیم فسفاتاز تولید کرده ولی قادر به تولید آنزیم اوره‌آز، تولید رنگ فلورسانت روی محیط KB ، هیدرولیز توئین ۸۰ و تولید متیل‌رد (MR) نبودند. همچنین کلیه استرینها در آزمونهای ۳-کتولاکتوز، فنیل‌آلانین‌دآمیناز، دی‌اکسی‌ریبونوکلئاز و تولید رنگدانه آبی روی محیط YDC منفی بودند.

تمامی استرینها قادر به احیاء نیترات به نیتریت بوده و توانستند از پپتون، تیوسولفات سدیم و سیستئین H_2S تولید کنند. همچنین در آزمونهای رشد در دمای ۳۶-۳۷ ° C ، ۳۹-٤۰ °C ، تحمل ٪۳ کلرید سدیم، تولید مواد احیاء کننده از سوکروز، گاز از گلوکز، هیدرولیز اسکولین و هیدرولیز ژلاتین مثبت بودند.

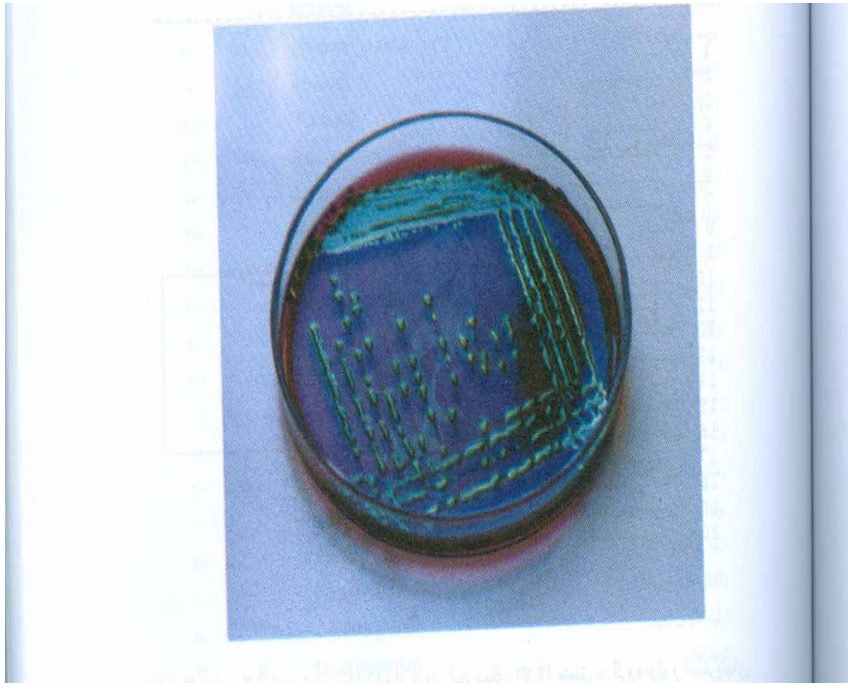
در آزمونهای تحمل ٪٤ و ٪۵ کلرید سدیم به ترتیب ٪٦۵ و ٪٦۰ استرینها مثبت بودند و در آزمونهای هیدرولیز نشاسته و هیدرولیز کازئین به ترتیب ٪۵۵ و ٪٦۰ استرینها مثبت بود. پنجاه‌وپنج درصد استرینها لوان مثبت، ٪٤۰ آرژینین‌دی‌هیدرولاز مثبت و ٪٦۵ آنها قادر به تولید

www.SID.ir

Archive of SID

استوئین(VP) بودند.

از نظر خصوصیات بیوشیمیایی، کلیه استرینها قادر به تولید اسید یا استفاده از دی- گلوکز، دی‌فروکتوز، دی-گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، دی-سوکرز، دی-ملی‌بیوز، دی-مانوز، سالیسین، دی-ریبوز، ال-رامنوز، دی-زایلوز، گلیسرول و مانیتول بودند. از قندها و پلی‌الکلهای ترهالوز ٪۵۵، α -متیل‌دی-گلوکوزید ٪۶۰، رافینوز ٪۹۵، ال-آرابینوز ٪۸۵، دکسترین ٪۵۵، نشاسته ٪۸۵، مالتوز ٪۶۰، سوربوز ٪۵۵، پالاتینوز ٪۶۵، اینولین ٪۹، آمیگدالین ٪۵۵، سوربیتول ٪۶۰، دلسیتول ٪۴۵، اینوزیتول ٪۹۵، ادنیتول ٪۳۵، و اتانل ٪۷۵ استرینها استفاده یا تولید اسید نمودند. هیچکدام از استرینها قادر به استفاده و یا تولید اسید از مزو-اریتریتول نبودند.



شکل ۲- کلنیهای*Pectobacterium*های عامل پوسیدگی باکتریایی ساقه روی محیط کشت EMB

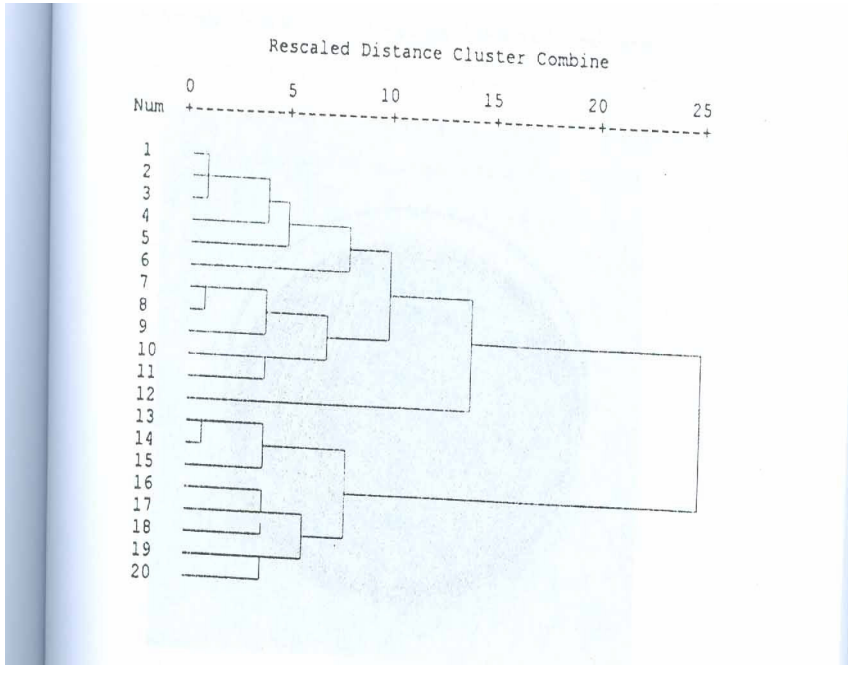
Fig. 2. Colonies of *Pectobacterium* strains isolated from corn plants with stalk rot symptoms on EMB.

www.SID.ir

Archive of SID

همه استرینها از نمکهای فورمات، لاکتات، سیترات و مالونات به عنوان منبع کربن استفاده کردند. از ال-تارتارات، دی-تارتارات، گالاکتورونات، مالات، گالات و گلوکونات بـه ترتیـب ٪۹۵، ٪۳۰، ٪٤٥، ٪۹۰، ٪٦٥، ٪۷٥ استرینها به عنوان منبع کربن استفاده نمودند. از ال-پرولین و ال-سرین نیز به ترتیب ٪٦۰ و ٪۷٥ استرینها استفاده کردند.

در نتایج آزمونهای فنوتیپی انجام شده تنوع بسیار بالایی مشاهده شد. دندروگرام شباهتهای استرینهای جدا شده ترسیم گردید. این استرینها در دو گروه (Phenon) قرار گرفتند (شـکل ۳). خصوصیات فنوتیپی هریک از گروهها در جدول یک خلاصه شده است.



شکل ۳- دندروگرام استرینهای جدا شده از ذرت. استرینهای ۱تا ۱۲ متعلق به گـروه اول و اسـترینهای ۱۳ تا ۲۰ متعلق به گروه دوم می باشند.

Fig. 3. Dendrogram of *Pectobacterium* strains isolated from corn based on average linkage between groups.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- گروه‌بندی استرینهای پکتوباکتریومهـای جـدا شـده از ذرت بـر اسـاس شـباهتهای فنوتیپی

Table 1. Groupping of *Pectobacterium* strains isolated from corn on the basis of phenotypic similarity

درصد استرینهای مثبت هر گروه Percentage of positive isolates		نام آمون(Test)	
۲ (۸)	۱ (۱۲)a		
۰	۰	(Gram reaction)	رنگ آمیزی گرم
۰	۰	KOH(3%)	واکنش گرم(پتاس۳٪)
۱۰۰	۱۰۰	(Fermentative metabolism)	رشد بی هوازی(O/F)
۰	۰	(Oxidase)	اکسیداز
۱۰۰	۱۰۰	(Catalase)	کاتالاز
۱۰۰	۱۰۰	(Soft rot on potato)	لهانیدن ورقه های سیب زمینی
۱۰۰	۵۰	(Lecithinase)	لسیتیناز
۱۰۰	۱۰۰	(Phosphatase production)	تولید فسفاتاز
۱۰۰	۳٤	(Indole production)	تولید اندول
۱۰۰	۱۰۰	(Reducing substance from sucrose)	تولید مواد احیاء کننده از سوکرز(RSS)
۱۰۰	۱۰۰	(Growth at 36-37°C)	رشد در دمای ۳۶ –۳۷° C
۱۰۰	۱۰۰	(Growth at 39-40°C)	رشد در دمای ۳۹-٤۰° C
۰	۱۰۰	(Growth on 5% NaCl)	رشد در حضور ۵٪کلرید سدیم
۱۲	۱۰۰	(Growth on 4% NaCl)	رشد در حضور ٤٪کلرید سدیم
۱۰۰	۱۰۰	(Growth on 4% NaCl)	رشد در حضور ۳٪کلرید سدیم
۰	۰	(Production of blue pigment on YDC)	تولید رنگ آبی روی محیط YDC
۱۰۰	٤۲	(Acetoin production)	تولید استوئین(VP)
۰	۰	(Methyl- red)	واکنش متیل رد(MR)
۱۰۰	۱۰۰	(Gas from glucose)	تولید گاز از گلوکز
۱۲	۸۳	(Levan production)	تولید لوان

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continue) جدول ۱- (ادامه)

هیدرولیز نشاسته	(Starch hydrolysis)	۸۳	۲۵
هیدرولیز اسکولین	(Esculin hydrolysis)	۱۰۰	۱۰۰
هیدرولیز کازئین	(Casein hydrolysis)	٦۷	۵۰
هیدرولیز ژلاتین	(Gelatin hydrolysis)	۱۰۰	۱۰۰
هیدرولیز توئین ۸۰	(Tween 80 hydrolysis)	۰	۰
تولید کتولاکتوز	(Keto lactose production)	۰	۰
آرژینین دی هیدرولاز	(Arginin dihydrolase)	۷۵	۰
فنیل آلانین د آمیناز	(Phenylalanin deaminase)	۰	۰
داکسی ریبونوکلئاز	(Deoxyribonuclease)	۰	۰
فوق حساسیت	(Hypersensitive reaction)	٤۲	۷۵
تولید رنگ فلورسانت روی KB	(Fluorescent production on KB)	۰	۰
احیاء نیترات	(Nitrate reduction)	۱۰۰	۱۰۰
اوره آز	(Urease production)	۰	۰
تولید H_2S از پپتون	(H_2S production from pepton)	۱۰۰	۱۰۰
تولید H_2S از تیوسولفات	(H_2S production from thiosulfate)	۱۰۰	۱۰۰
تولید H_2S از سیستئین	(H_2S production from cysteine)	۱۰۰	۱۰۰
اثر روی شیر لیتموس :	(Litmus milk):		
اسیدی شدن	(Acidification)	۱۰۰	۱۰۰
ایجاد لخته	(Coaguation)	۱۰۰	۱۰۰
احیاء لیتموس	(Reducing of litmus)	۱۰۰	۱۰۰
استفاده از آسپاراژین به عنوان منبع کربن و ازت lization of asparagin as a carbon and nitrogen source)		۵۸	۷۵
استفاده از منابع کربنی:	(Carbohydrate source utilization):		
دی-گلوکز	(D-Glucose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-فروکتوز	(D-Fructose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-گالاکتوز	(D-Galactose)	۱۰۰	۱۰۰
سلوبیوز	(Celobiose)	۱۰۰	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continue) جدول ۱- (ادامه)

لاکتوز	(Lactose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-سوکرز	(D-Sucrose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-ملی بیوز	(D-Melibiose)	۱۰۰	۱۰۰
ال-رامنوز	(L-Rhamnose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-مانوز	(D-Mannose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-ریبوز	(D-Ribose)	۱۰۰	۱۰۰
دی-زایلوز	(D-Xylose)	۱۰۰	۱۰۰
سالیسین	(Salicin)	۱۰۰	۱۰۰
گلیسرول	(Glycerol)	۱۰۰	۱۰۰
مانیتول	(Mannitol)	۱۰۰	۱۰۰
ترهالوز	(Trehalose)	۹۲	۰
α- متیل‌دی-گلوکوزید	(α- Methyl D-Glycoside)	۱۰۰	۰
رافینوز	(Raffinose)	۱۰۰	۸۷
ال-آرابینوز	(L-Arabinose)	۱۰۰	٦۳
دکسترین	(Dexterin)	۹۲	۰
مالتوز	(Maltose)	۱۰۰	۰
ملی‌زیتوز	(Melezitose)	۸	۰
سوربوز	(Sorbose)	۹۲	۰
نشاسته	(Starch)	۱۰۰	٦۲
اینولین	(Inulin)	۱۳	۰
پالاتینوز	(Palatinose)	۱۰۰	۲۵
آمیگدالین	(Amygdaline)	۹۲	۰
سوربیتول	(Sorbitol)	۱۰۰	۰
دولسیتول	(Dulcitole)	۷۵	۰

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continue) جدول ۱- (ادامه)

اینوزیتول	(Inositole)	۱۰۰	۸۷
ادنیتول	(Adonitole)	۵۸	۰
مزواریتریتول	(Meso-erythritol)	۰	۰
اتانل	(Ethanol)	۱۰۰	۳۸
لاکتات	(Lactate)	۱۰۰	۱۰۰
فورمات	(Formate)	۱۰۰	۱۰۰
سیترات	(Citrate)	۱۰۰	۱۰۰
مالونات	(Malonate)	۱۰۰	۱۰۰
ال-تارتارات	(L-Tartrate)	۱۰۰	۸۷
دی-تارتارات	(D-Tartrate)	۵۰	۰
گالاکتورونات	(Galacturonat)	۸	۱۰۰
گلوکونات	(Gluconate)	۵۰	۹۲
مالات	(Malate)	۱۰۰	۸٤
گالات	(Galate)	۲۵	۹۲
ال-سرین	(L-Serine)	۳۸	۱۰۰
ال-پرولین	(L-Proline)	۲۵	۸٤

تمامی استرینهای جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیکهای آموکسی‌سیلین و ونکومایسین مقاوم و نسبت به آنتی‌بیوتیکهای توبرامایسین، جنتامایسین، سفالوتین، کانامیسین، آمیکاسین، استرپتوماسین، کلرامفنیکل و دوکسی‌سیلین حساس بودند. واکنش استرینها نسبت به آنتیبیوتیکها (مقاوم) در جدول ۲ خلاصه شده است.

کلیه استرینهایی که به گونه *P. chrysanthemi* نسبت داده شدند، قادر به رشد در ۳۹°C و تولید اسید از هیدروکربنهای دی-آرابینوز، مانیتول، ملی‌بیوز، رافینوز، سالیسین و دی-سلوبیوز بوده ولی توانایی استفاده از اینولین را نداشته و همچنین قادر به هیدرولیز آرژینین در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

بی‌هوازی نبودند.

جدول۲- درصد استرینهای مقاوم پکتوباکتریومها نسبت به آنتی‌بیوتیکها

Table 2. Percentage of *Pectobacterium* strains resistance to antibiotcs

نام آنتی‌بیوتیک (Antibiotic)		درصد استرینهای مقاوم هر گروه Percentage of strains resistant in each group	
		۱ (۱۲) a	۲ (۸)
آموکسی سیلین	(Amoxycilin)	۱۰۰	۱۰۰
ونکومایسین	(Vancomycin)	۱۰۰	۱۰۰
اگزاسیلین	(Oxacilin)	۹۲	۰
پنی‌سیلین	(Penicillin)	۹۲	۰
آمپی‌سیلین	(Ampicillin)	۹۲	۰
اریترومایسین	(Erythromycin)	۰	۰
سفالوتین	(Cephalothin)	۰	۰
نئومایسین	(Neomycin)	۲۵	۰
کاناماپسین	(Kanamycin)	۰	۰
کلرامفنیکل	(Chloramphenicol)	۰	۰
تتراسیکلین	(Tetracycline)	۰	۰
نالیدیکسیک‌اسید	(Nalidixic acid)	۲۵	۰
آمیکاسین	(Amykacin)	۰	۰
جنتامایسین	(Gentamicin)	۰	۰
دوکسی‌سیلین	(Doxyciline)	۰	۰
استرپتومایسین	(Streptomycin)	۰	۰
توبرامایسین	(Tobramycin)	۰	۰
سفالکسین	(Cephalexin)	۰	۰

استرینهای جدا شده توانایی استفاده از دی-تارتارات را به عنوان منبع کربن نداشته و از

www.SID.ir

Archive of SID
گالات، ال-تارتارات، ال-سرین و پرولین به ترتیب ٪۳۷، ٪۸۸، ٪۳۷ و ٪۲۵ استرینها به عنوان منبع کربن، استفاده کردند. همچنین ٪۳۷ استرینها قادر به رشد روی اتانل بودند.

تمامی استرینهای جدا شده در دمای ۳۰ -۲۵ °C قادر به ایجاد پوسیدگی در غده‌های سیب‌زمینی بوده و در دمای ۲۸ °C قادر به ایجاد علائم لهیدگی در ساقه ذرت بودند.

استرینهای CD_{12}, CD_{11}, CD_8, CD_7, CD_4 متعلق به گروه اول تنها در محل قرارگیری یک باند قوی با یکدیگر تفاوت داشتند ولی در مقایسه با استرینهای استاندارد Ech SCRI# 4064، Ecc UPB 066 تفاوتهای کلی نشان دادند.

نقوش الکتروفورزی استرینهای CD_{15}, CD_{13}, CD_5, CD_2 متعلق به گروه دوم با یکدیگر و با استرین استاندارد Ech 4064 مقایسه شدند. استرینهای CD_5, CD_2 نسبت به سایر استرینها دارای یک باند قویتر بوده و بقیه استرینها یک باند قوی بیشتر از استرین CD_5 داشتند. این استرینها در مقایسه با استرین استاندارد Ech 4064 در محل قرارگیری یک باند قوی تفاوت داشتند (شکل ٤).

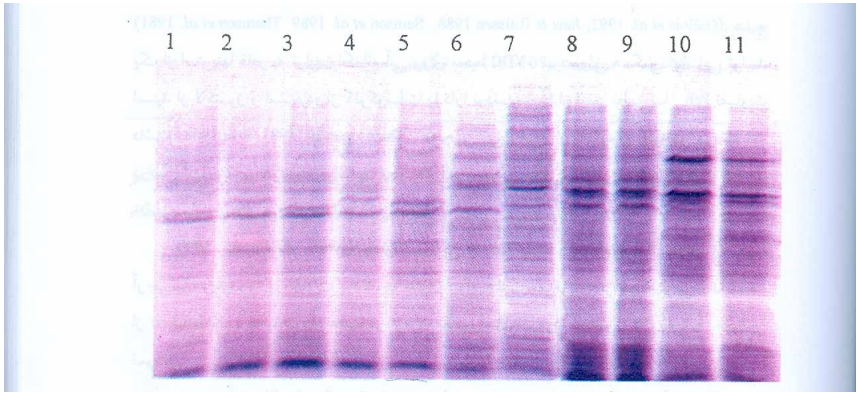
بحث

خصوصیات فنوتیپی استرینهای جدا شده نشان داد که همگی جزء گروه اروینیاهای پکتولیتیک (Pectolytic erwinias) می‌باشند (Jans & Russin 1988, Perombelon & Vander Wolf 1998, Smith & Burtz 1990, Thamson *et al.* 1981). با ترسیم دندروگرام، ارتباط بین استرینها مشخص شده و در دو گروه قرار گرفتند. استرینهای گروه اول در آزمونهای فسفاتاز، مصرف مالونات، حساسیت به اریترومایسین، هیدرولیز ژلاتین، تولید گاز از گلوکز، لسیتیناز(٪۵۰ استرینها)، تولید اندول (٪۳٤ استرینها) و آرژینین‌دی‌هیدرولاز به گونه *P. chrysanthemi* شباهت داشتند. اما قادر بودند در حضور ٪۵ کلریدسدیم رشد کرده و از قندهای سوربیتول، ترهالوز، مالتوز، آمیگدالین، α - متیل گلوکوزید وپالاتینوز اسید تولید کنند و بعلاوه قادر به تولید مواد احیاء کننده از سوکرز (RSS) بودند. بنابراین به گونه‌های *P. atrosepticum* و *P. betavascularum* و زیرگونه *P. c.* subsp. *odoriferum* نیز شبیه بودند (Gallois *et al.* 1992 , Thamson *et al.* 1981). تفاوت آنها با گونه Pa در آزمونهای رشد در دمای

www.SID.ir

Archive of SID

°C ۳۷ –۳٦ ، تولید اسید از سوربیتول و هیدرولیز ژلاتین بود. بعلاوه با تولید اسید از سوربیتول، سلوبیوز، اینولین، رافینوز و مصرف سیترات ازگونه Pb متمایز بودند. تفاوت آنها با زیرگونه Pco در تولید اسید از آمیگدالین، مصرف گلوکونات، ال–تارتارات، دی–تارتارات (۵۰٪ استرینها) و تجزیه آرژینین در شرایط بی‌هوازی بود. لذا نمی‌توان با قاطعیت در مورد گونه یا زیر گونه آنها اظهار نظر نمود. *اسمیت و بارتز* (Smith & Burtz 1990) دو استرین از اروینیاهای پکتولیتیک را شناسایی کردند که در دمای °C ۳۷ –۳٦ رشد کرده و قادر به تولید مواد احیاءکننده از سوکرز نبودند ولی توانایی تولید اسید از α – متیل گلوکوزید و پالاتینوز را داشتند. آنها این استرینها را به زیرگونه Ecc نسبت دادند. *جوانویچ* (Jovanovic 1998) استرینهای متعلق به زیرگونه Ecc جدا شده از آفتابگردان را به دلیل توانایی تولید اسید از مالتوز، به عنوان یک تاکسون جدید از گروه *Erwinia carotovora* معرفی کرد.



شکل٤– نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی استرینهای پکتوباکتریوم جدا شده از ذرت در ژل پلی اکرل آمید ٪۱۲؛ چاهک‌ها شامل نقوش استرینهای

1, CD_{12}; 2, CD_{11}; 3, CD_8; 4, CD_7; 5, CD_4; 6, Pcc UPB 066; 7, Pch SCRI# 4064; 8, CD_{15}; 9, CD_{13}; 10, CD_5; 11, CD_2 هستند

Fig. 4. Electrophoretic profiles of cell proteins of *Pectobacterium* strains isolated from corn in polyacrylamide gel. Strains were 1, CD_{12}; 2, CD_{11}; 3, CD_8; 4, CD_7; 5, CD_4; 6, Pcc UPB 066; 7, Pch SCRI# 4064; 8, CD_{15}; 9, CD_{13}; 10, CD_5; 11, CD_2.

www.SID.ir

Archive of SID

صفات متغیر استرینهای جدا شده از این میزبان در مقایسه با جداول افتراقی گونه‌ها و زیر گونه‌های شناخته شده در تولید اسید از گالاکتورونات و فورمات، هیدرولیز نشاسته و تولید فسفاتاز، مواد احیاکننده از سوکرز، گاز از گلوکز و لوان می‌باشد.

استرینهای این گروه از نظر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بیشترین شباهت را به همدیگر داشتند. ولی تطابق کاملی با گونه‌ها و زیرگونه‌های شناخته شده پکتوباکتریومها نداشتند. بنابراین، نمی‌توان با قاطعیت در مورد گونه یا زیرگونه آنها اظهارنظر نمود. این حالت بینابین می‌تواند ناشی از تغییرپذیری وراثتی (genetic variability) فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی باشد (Jovanovic 1998). لذا، احتمال می رود استرینهای این دو گروه متعلق به زیرگونه جدیدی باشند.

استرینهای گروه دوم به بیووار سه گونه *P. chrysanthemi* (Pch) نسبت داده شدند (Gallois *et al.* 1992, Jans & Ruissen 1988, Samson *et al.* 1989 Thamson *et al.* 1981). هیچ یک از استرینها قادر به تولید رنگدانه آبی روی محیطYDC نبوده ولی همگی توانایی تولید اسید از لاکتوز و استفاده از گلوکونات را دارا بودند، لذا از این نظر با Pch تفاوت داشتند(Thamson *et al.* 1981, Dye 1968). همچنین تولید اسید از پالاتینوز، اینوزیتول و نشاسته در بین آنها متغیر بود. در توانایی مصرف ال- سرین و ال- پرولین متغیر بودند که با خصوصیات بیووار سه نیز متفاوت می‌باشد.

Ngwira &Samson 1990چهاراسترین جدا شده از ذرت را که در آزمون آرجی‌نین‌دی‌هیدرولاز متفاوت بودند، به عنوان بیوار هشت معرفی و نیز سه استرین جدا شده از Kalanchoe را که با بیووار هفت در آزمون مذکور متفاوت بود، به عنوان بیووار نه معرفی نمودند.

همچنین در مطالعاتی که قبلا توسط فریدونی و ظهور صورت گرفته است، (Feridooni 1994, Zohour 1998) مشخص شده که خصوصیات پکتوباکتریومهای جدا شده از سیب‌زمینی از مناطق تربت‌حیدریه، اردبیل و فارس تطابق کاملی با جداول افتراقی گونه‌ها و زیرگونه‌ها ندارند. بنابراین در صورت جمع‌آوری استرینهای بیشتر از محصولات مختلف در سایر مناطق و انجام مطالعات تکمیلی احتمال می‌رود بتوان زیرگونه جدیدی را معرفی نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

استرینهای مورد مطالعه، از نظر نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی نیز تنوع زیادی از خود نشان دادند. تعدادی از استرینها با استرینهای استاندارد شباهتهای کلی داشتند ولی کاملاً یکسان نبودند. همچنین استرینهای که در چند آزمون فنوتیپی با یکدیگر تفاوت داشتند، نقوش الکتروفورزی آنها نیز تفاوتهایی را نشان داد. تمامی استرینهای جدا شده از ذرت قادر به ایجاد لهیدگی در ساقه ذرت بودند.

قدردانی

از شورای پژوهشی دانشگاه مازندران به خاطر تامین بخشی از اعتبارات مورد نیاز برای اجرای این پژوهش و گروه بیوشیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به خاطر فراهم کردن امکانات آزمایشات الکتروفورزی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (105-101) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: رحیم احمدوند، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج و دکتر حشمت‌اله رحیمیان، بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران

www.SID.ir