

بیماریهای گیاهی، جلد ۴۲، ۱۳۸۵

تنوع جدایه‌های *Agrobacterium tumefaciens* در ایران*

Diversity of *Agrobacterium tumefaciens* strains in Iran

ساناز صالحی**، حشمت‌اله رحیمیان و ابوالقاسم قاسمی

موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی و دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران

پذیرش ۱۳۸۵/۵/۲۵

دریافت ۱۳۸۴/۸/۲۲

چکیده

با توجه به وسعت پراکنش بیماری سرطان طوقه در سطح کشور، دامنه میزبانی وسیع باکتری عامل بیماری و همچنین میزان خسارات وارد شده به محصولات کشاورزی، بررسی این بیماری و عامل آن اهمیت زیادی دارد. در این راستا، ۴۰ جدایه اگروباکتریوم از میزبان‌های متفاوت و مناطق مختلف کشور جداسازی و شناسایی گردید. جدایه‌ها براساس خصوصیات فنوتیپی به سه گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل گونه *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) بوده و خصوصیات بیوشیمیایی یکسانی داشتند. گروه دوم جدایه‌های بدست آمده از مو بودند، که در اکثر صفات بیوشیمیایی به گونه *A. tumefaciens* تعلق داشتند. گروه سوم، جدایه‌های گیلاس از منطقه آهار با ویژگی‌های تغذیه‌ای متفاوت بودند. اعضای این گروه تحت شرایط خاص بر روی میزبان اصلی علائم بیماری را ظاهر نمودند.

پروفیل پلاسمیدی در تمامی جدایه‌های مورد بررسی یکسان بود. همچنین جدایه‌ها در * قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه آزاد واحد علوم

تحقیقات

** مسئول مکاتبه

الگوی نقوش پروتئینی در نواحی باندهای سنگین مشابه بوده و فقط در چند باند میانی تفاوت نشان دادند، به طوری که تفاوت درون گونه‌ای بیش از بین گونه‌ای بود. در آزمون BOX-PCR جدایه‌ها تنوع وسیعی نشان داده و به دو دسته اصلی تقسیم شدند. درصد تشابه بسیار پایین در بین جدایه‌ها، حتی در سویه‌های جدا شده از یک منطقه جغرافیایی، بیانگر ناهمگونی بالا حتی در سطح هر منطقه می‌باشد. براساس نتایج بررسی حاضر، خصوصیات فنوتیپی می‌تواند به عنوان معیار کلیدی در تشخیص گونه‌های آگروباکتریوم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium tumefaciens* پروفیل پروتئینی، پلاسمیدی و BOX-PCR

مقدمه

نخستین گزارش از بیماری سرطان طوقه درختان میوه در ایران مربوط به سال ۱۳۳۷ از ارومیه می‌باشد (Amani 1966)، متعاقباً آلودگی از استانهای مختلف کشور گزارش گردید. این بیماری در سال ۱۳۷۲ از استان فارس، کهگیلویه و بویر احمد (Ale-Yassen & Banihashemi 1993) و در سال ۱۳۷۷ از کرج و تاکستان تحت گونه *Agrobacterium vitis* جداسازی و شناسائی گردید (Fatehi et al. 1998). همچنین در سال ۱۳۷۹ به یک مورد جدایه آگروباکتریوم بیووار I در میان سویه‌های *A.vitis* در تاکستانهای کهگیلویه و بویر احمد اشاره شد (Salahi et al. 1998). معرفت و حسن‌زاده در سال ۱۳۷۷ *Agrobacterium tumefaciens* را از نهال‌های سیب و گیلاس وارداتی در دماوند، کلاردشت و ارومیه گزارش نمودند (Marefat & Hassanzadeh 1998). آلودگی به این باکتری در نهالهای آلو، هلو و شلیل در باغهای میوه کشت و صنعت مغان توسط معرفت در سال ۱۳۷۹ به اثبات رسید. این جدایه‌ها از نظر پروفیل پروتئینی و پلاسمیدی مشابه بودند (Marefat et al. 2000). عامل بیماری سرطان طوقه اغلب، گونه‌های *Agrobacterium tumefaciens*، *A.vitis* و *A. larrymoorei* می‌باشد که اولی اختصاص به تعدادی از درختان میوه، بعضی گیاهان زراعی و زینتی داشته، ولی گونه آخر تنها از گیاه فیکوس جدا و شناسایی شده است (Bouzar and Jones 2001). *A. vitis* نیز به طور اختصاصی، عامل بیماری در انگور می‌باشد،

لیکن فرایند آلوده سازی میزبان توسط این باکتری ظاهراً متفاوت است. طبقه‌بندی آگروباکتریوم سالها براساس خصوصیات بیماریزایی صورت می‌گرفت سپس این طبقه‌بندی براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی به بیوتا‌پ I و II تغییر یافت. طبقه‌بندی بر پایه خصوصیات ژنتیکی آگروباکتریومها را به سه بیووار گروه‌بندی نمود و در نهایت بیووار ۱، ۲ و ۳ به ترتیب *A. rhizogenes*، *A. tumefaciens* و *A. vitis* نامیده شدند (Bouzar and Jones 2001).

یانگ و همکاران (Young et al. 2001) براساس توالی 16S rRNA آگروباکتریومها را جزو رایزوبیومها طبقه‌بندی کرده و نام *Agrobacterium* را به *Rhizobium* تغییر دادند. در این طبقه‌بندی همچنین نام گونه *A. tumefaciens* به *R. radiobacter* تغییر یافت.

هدف از بررسی حاضر شناسایی گونه‌های باکتری عامل سرطان طوقه و ریشه، توصیف گونه‌ها و بررسی تنوع جدایه‌های پراکنده شده در مناطق مهم کاشت درختان میوه در کشور است.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌های دارای علائم گال طوقه از انواع گیاهان نظیر مو (*Vitis vinifera*) در شهرستان قزوین و هشتگرد، بادام (*Amygdalus communis*) مشهد، سیب (*Malus pumila*) دماوند، شلیل (*Prunus persicae var. spinosa*) مازندران، گیلان (*Prunus avium*) مغان و آهار (استان تهران)، هلو (*Prunus persica*)، مغان، چغندر (*Beta vulgaris*) مشهد و رز (*Rosa orientalis*) اصفهان جمع‌آوری شده، نواحی متورم مشکوک به گال پس از شستشوی سطحی با آب دو بار به مدت ده دقیقه در بشر حاوی آب ژاول ۲۰٪ روی شیکر ضد‌عفونی گردید. قطعات مشکوک با قیچی باغبانی سترون خرد شده و در لوله آزمایش حاوی آب مقطر سترون ریخته شد همچنین گالهای جوان مستقیماً پس از جداسازی از گیاه در داخل هاون سترون حاوی چند قطره آب مقطر کاملاً له شدند و از سوسپانسیون حاصل روی محیط سیب‌زمینی دکستروز کربنات کلسیم آگار (PDA+ CaCO₃) کشت خطی تهیه شد. تشتک‌های کشت شده در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری گردید و دو تا سه روز پس از کشت، تک کلنی‌های مظنون سفید شیری و لعابدار

انتخاب و روی آگار غذایی (nutrient agar) تکثیر گردیدند. جدایه‌ها روی محیط فوق و نیز در آب مقطر سترون در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جدایه‌ها در محیط حاوی ۱۰٪ شیر و ۱۰٪ آب پیتونه سوسپانسیون و لیوفیلایز (lyophilized) گردیدند (Schaad et al. 2001). از کلکسیون باکتریهای پاتوژن گیاهی نیوزلند (ICMP)، جدایه‌های *A. rubi* (ICMP:6428) و *A. larrymoorei* (NCPBP:4096) و *tumefaciens* (ICMP:8317) به‌عنوان جدایه‌های استاندارد دریافت شد.

آزمون بیماریزایی و دامنه میزبانی

قابلیت جدایه‌ها در ایجاد گال در گیاهچه و گیاهان جوان شامل گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*)، آفتابگردان (*Solanum annuum*)، تاتوره (*Datura stramonium*)، کدو مسمایی (*Cucurbita pepo*) و بعضی از گیاهان میزبان (گیلاس، رز) مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه‌ها پس از دو روز کشت در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد توسط سوزن سترون برداشت شده و روی شاخه جوان (۶ هفته‌ای) گوجه‌فرنگی (رقم Bony Best) مایه‌زنی و محل مایه‌زنی با پارافیلیم پوشانده شد. گیاهان مایه‌زنی شده به مدت ۳ تا ۴ هفته در گلخانه با رطوبت بالا نگهداری گردید. آزمون بیماریزایی با مایه‌زنی باکتری به لایه مرستمی برشهای هویج و نگهداری تشتک‌های حاوی برشها در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد تکرار شد (Schaad et al. 2001).

از جدایه‌هایی که با وجود شباهت فیزیولوژیک به آگروباکتریوم با هیچ یک از روشهای فوق قادر به ایجاد بیماری نبودند سوسپانسیون تهیه گردیده و به همراه کمی هورمون محرک ریشه زایی (IBA) (indol butyric acid)، به گلدان ماسه سترون حاوی قلمه‌های گیاه اضافه شد. گلدان‌ها به مدت یک ماه در دمای ۲۳ درجه نگهداری شدند. از گلدانهای حاوی قلمه فاقد سوسپانسیون نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از یک ماه، قلمه‌ها از خاک خارج شده و از نظر بروز یا عدم بروز علائم بررسی گردیدند.

پس از اثبات بیماریزایی جدایه‌های مورد بررسی، توانایی بیماریزایی آنها با روش یادشده روی چند گیاه میزبان از جمله: آلبالو (*Prunus cerasus*)، گلابی (*Pyrus communis*)، سیب، آلو (*Prunus domestica*)، زردآلو (*Prunus armeniaca*)، بادام و چغندر مورد آزمایش قرار گرفت.

خصوصیات فیزیولوژیک

آزمونهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای به روشهای معمول برای باکتریهای بیماریزا انجام و مورفولوژی کلنی‌ها روی محیط‌های IA, DI بررسی گردید (Schaad et al. 2001, Sule 1977).

الکتروفورز پروتئین

پس از استخراج پروتئینهای سلولی از جدایه‌های ایرانی و نیز جدایه‌های استاندارد، براساس روشی که قبلاً تشریح شده است (Rahimian 1995) الکتروفورز در ژل پلی اکریل امید ۱۴٪ با استفاده از سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) صورت گرفت. الکتروفورز با شدت جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر انجام شد و ژل در محلول ۱٪ / ۰/۱ کومازی بلو در محلول متانول، اسید استیک، آب (حجم ۵:۱:۵) به مدت سه ساعت رنگ‌آمیزی و بعد در همان محلول ولی فاقد رنگ، رنگ بری و در اسید استیک ۷٪ نگهداری گردید.

پروفیل پلاسمید

جدایه‌های باکتری روی محیط کشت NA به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه کشت داده شدند سپس سلولها در دو میلی لیتر بافر TE (۵۰ میلی مول تریس، ۲۰ میلی مول EDTA، pH 8) سوسپانسیون گردیده، پس از ۵ دقیقه SDS ۱۰٪ به غلظت نهایی ۱٪ به سوسپانسیون افزوده شد، پس از لیز شدن سلولها استخراج پلاسمید با روش کوریر و نستر (Currier & Nester 1976) صورت گرفت. از *Escherichia.coli* دارای پلاسمیدی با وزن 100Kbp به عنوان نشانگر استفاده شد. الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸٪ حاوی اتیدیوم بروماید (نیم میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۵۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت انجام شد. پس از شستشو با آب مقطر، ژل با نور فرا بنفش مشاهده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در مورد جدایه‌هایی که بیماریزایی آنها از طریق مایه‌زنی گیاهان محک به اثبات نرسیده بود، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جهت اثبات وجود پلاسمید بیماریزایی (Ti) صورت گرفت.

الف) جداسازی دی ان آ

جهت جداسازی دی ان آ جدایه‌ها از روش لیز سریع باکتریایی استفاده شد. یک کلونی از هر استرین به وسیله لوپ استریل در ته یک لوله ۰/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. باکتریها در ۲۰

میکرولیتر محلول ۰/۱٪ تریتون ۱۰۰-X (V/V) به حالت سوسپانسیون در آورده شد و با افزودن ۵ میکرولیتر از سود ۰/۴ نرمال و قرار دادن به مدت یک دقیقه در حمام آب جوش لیز شدند. سپس لوله‌ها بر روی یخ قرار گرفتند و پس از سرد شدن، ۵ میکرولیتر Tris-HCl یک مولار با pH ۷/۶ به آنها اضافه شد. از این سوسپانسیون به عنوان دی آنالگو در هر واکنش استفاده گردید (Eastwell et al. 1995).

آزمایش در داخل لوله‌های ۵۰۰ میکرولیتری و در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگر (Vir D2)A-E با توالی:

5'ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT3'
5'CCT GAC CCA AAC ATC TCG GCT GCC CA3'

از ژنهای اصلی در بیماریزایی، انجام شد (Haas et al 1995).

لوله‌های حاوی مخلوط واکنش پس از ۲/۵ دقیقه در ۹۵ درجه با پروفیل دمائی شامل ۴۰ چرخه، ۱ دقیقه در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه و ۷ دقیقه در ۷۲ درجه توسط دستگاه ترموسایکلر (ژن تک شرکت استوارت، انگلیس) تکثیر و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردیده و با لامپ UV مشاهده و عکسبرداری شد (Sawada et al. 1995).

تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌ها با استفاده از آغازگر BOX

جداسازی دی آن آ

حدود ۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون کدر باکتری (OD₆₀₀=1) در بافر TBE تهیه شده و به آن ۰/۱ حجم ۰٪ SDS افزوده شد. DNA حاصل از لیز باکتریایی با استفاده از روش آزوبیل و همکاران (Ausubel et al 1987) خالص‌سازی گردید. کلاف DNA در آب مقطر دو بار تقطیر حل شده و از آن رقت ۱۰^{-۳} تهیه گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، OD محلول محاسبه شده، غلظت DNA محلول براساس هر واحد OD معادل ۵۰ ng/μl DNA محاسبه و مطابق آن حجم لازم برای انجام واکنش تعیین گردید.

این آزمایش در داخل لوله‌های ۵۰۰ میکرولیتری و در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. DNA الگو به میزان ۵۰ نانوگرم، آغازگر BOX ۰/۵ میکرولیتر و آنزیم Taq polymerase (سیناژن) به میزان ۰/۳ میکرولیتر از این حجم را تشکیل دادند، بافر تریس حاوی سولفات

امونیم به هر لوله به میزان ۵ میکرولیتر اضافه و پس از اختلاط به محلول ۵۰ میکرولیتر روغن سترون اضافه گردید. پروفیل دمایی استفاده شده شامل ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد و سپس ۳۳ چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۵۱ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۶۵ درجه سانتیگراد ۶ دقیقه بود. تکمیل طول رشته‌ها در آخر چرخه با نگهداری در ۷۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت (Versalovic et al. 1991). محصول PCR در ژل اکریل آمید (۸٪) با جریان ثابت ۲۵ میلی امپر تا رسیدن رنگ پیشرو (برم فنل بلو) به انتهای ژل الکتروفورز گردید (Bassam and Caetano-Anolles 1993) و با رنگ‌آمیزی نترات نقره باندها مشاهده و عکسبرداری شد (Neilan et al. 1995). با مقایسه ستونها از نظر وجود یا عدم وجود باند و نمره‌دهی به ترتیب یک و صفر جدول تشابه جدایه‌ها تهیه گردید. با استفاده از برنامه آماری NTSYS pc با استفاده از فرمول ژاکارد $a/a+b+c$ ، تعداد خطوط مشترک در دو جدایه مورد مقایسه، b تعداد باندهای موجود در یکی که در جدایه دیگر وجود ندارد و c باندهایی که در جدایه بعدی وجود دارد و در قبلی موجود نبوده است) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند. گروه‌بندی جدایه‌ها و سپس دندروگرام نهایی براساس مقایسه میانگین بدون وزن UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean)، طراحی شد.

در این بررسی از سه گونه آگروباکتریوم (*A. rubi* (ICMP:6428)، *A. tumefaciens* (ICMP:8317) و (*A. larrymoorei* NCPPB:4096) اخذ شده از کلکسیون‌های بین‌المللی (ICMP, NCPPB در استرالیا به عنوان مقایسه استفاده گردید.

نتیجه

جداسازی

از مجموع ۵۰ گال از میزبانهای ذکر شده، ۱۸۰ جدایه دارای پرگنه‌های مروارید مانند با حاشیه صاف و محدب، روی محیط PDA+CaCO₃ و پرگنه‌های لعاب‌دار، بنفش کم‌رنگ روی محیط IA و پرگنه‌های سفید تا سبز کم‌رنگ، ریز با حاشیه صاف از محیط D1 انتخاب و پس از اطمینان از عدم فلوئورسنت بودن روی محیط King B، روی NA کشت داده شد. جدایه گیلاس از استان تهران تنها قابلیت رشد بر روی محیط PDA+CaCO₃ را داشته و روی هیچ یک از

محیط‌های DI، IA رشد نکرد.

اثبات بیماریزایی

از بین ۱۸۰ جدایه، ۷۰ جدایه پس از گذشت ۳ هفته از مایه‌زنی روی گیاهان آزمون، گال ایجاد کردند. بین ۵ تا ۱۳ جدایه از هر میزبان و در مجموع ۵۰ نماینده برای بررسی‌های تکمیلی انتخاب گردید. پس از گذشت چهار تا شش هفته، در سطح گالها جوانه‌هایی ظاهر شد و یا در بخشهایی از گال نقاط جدیدی مجدداً برآمده شده و گالهایی جوان تولید نمودند. اندازه گالها نیز در جدایه‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۱). در بعضی، بیماریزایی بطور محسوسی از شدت بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها برخوردار بود، به طوریکه بعضی جدایه‌ها، گال‌هایی در دو طرف ساقه تشکیل دادند. از طرفی جدایه‌های گیلاس استان تهران و رز اصفهان روی هیچ یک از گیاهان آزمون تولید گال ننمودند و تنها روی میزبان اولیه بیماریزا بودند.

بهترین زمان جداسازی از گالها فصل‌های بهار و تابستان تشخیص داده شد. شرایط مایه‌زنی و نگهداری در گلخانه‌ها به عنوان عامل مهمی در ظهور علائم بیماری عمل کرده، به طوریکه در دمای بالای ۳۰-۲۷ درجه سانتیگراد، جدایه‌ها قادر به ایجاد گال نبودند. استفاده از سوسپانسیون باکتری در مقایسه با برداشت کلنی به وسیله سوزن موفقیت‌آمیز نبوده و گیاهان مایه‌زنی شده با سوزن آغشته به کلنی باکتری، در اکثر گیاهان ایجاد آلودگی کرده و علائم روی ساقه را ظاهر ساختند.

برای اطمینان از بیماریزایی جدایه‌ها، پس از تشکیل گال روی گیاهان آزمون، از گال جوان ایجاد شده سوسپانسیون تهیه و روی محیط $PDA+CaCO_3$ کشت داده شد. باکتری عامل گال مجدداً جداسازی گردیده و با انجام چند آزمون کلیدی (جدول ۱) با جدایه مایه‌زنی شده مطابقت داده شد. برخی از جدایه‌ها دوباره به میزبان اصلی (اولیه) مایه‌زنی شده و علائم حاصل بررسی گردید.

دامنه میزبانی

جدایه‌های به دست آمده از هلو، بادام، شلیل و سیب، بر روی طیف وسیعی از گیاهان خانواده رزاسه نظیر گیلاس، آلبالو، زردآلو و همچنین در گیاهان آزمون از جمله کدو مسمائی، آفتابگردان، گوجه‌فرنگی و تاتوره علائم بیماری را ظاهر کردند. جدایه‌های گیلاس استان تهران

تنها روی میزبان اصلی در شرایط مایه‌زنی خاص بیماریزا بودند. هیچ یک از جدایه‌های به دست آمده از هسته‌داران بر روی نهال‌های میوه دانه‌دار از قبیل سیب و گلابی بیماریزا نبودند. جدایه‌های رز تنها روی میزبان اصلی علائم بیماری را ایجاد کردند ولی جدایه بادام (مشهد) وسیعترین دامنه میزبانی را داشت. از طرفی استرین‌های جدا شده از چغندر، دامنه میزبانی محدودی داشته و تنها روی میزبان اصلی و گیاهان محک تولید گال نمودند. شدت بیماریزایی جدایه چغندر بر روی گیاهان آزمون بیشتر از سایر جدایه‌ها بود.

خصوصیات فنوتیپی

به جز جدایه‌های به دست آمده از انگور و گیلاس (استان تهران) تمامی ۳۲ جدایه مورد بررسی خصوصیات فنوتیپی یکسانی داشته و جدایه‌های انگور منطقه هشتگرد تنها چند تفاوت جزئی نشان دادند (جدول ۱ و ۲).

همه جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز مثبت، متحرک و هوازی اجباری بوده، و در آزمایش‌های تولید ۳-کتولاکتوز، ایجاد پلیکل در فریک‌آمونوم‌سیترات، رشد در دمای ۳۵ درجه، تحمل نمک ۲٪، هیدرولیز اسکولین، قلیایی و پروتئولیز کردن شیر لیتموس، هیدرولیز آرژنین و اوره مثبت بودند.

هیچکدام از جدایه‌ها روی محیط King B تولید رنگ فلئوئورسنت نمودند. تولید اندول، لوان، گاز H₂S از سیستمین، احیاء نیترات و هیدرولیز ژلاتین، توئین ۸۰ و نشاسته و استفاده از سیترات، مالونات و گلوکونات در همه جدایه‌ها منفی بود.

اکثر جدایه‌ها در تمامی آزمون‌ها با یکدیگر و همچنین با جدایه استاندارد *A.tumefaciens* مشابه بوده و این دسته از جدایه‌ها گروه A نامیده شدند. جدایه‌های این گروه تنها در استفاده از ال-لوسین و مزواریتریول نتایج متفاوتی نشان دادند.

جدایه‌های انگور که تنها در استفاده از تارتارات، سیترات، ال-آلانین، گلوکونات، زایلیتول، گلیسرین و فرمات متغیر عمل کرده و در معدودی از خصوصیات با *A.tumefaciens* تفاوت نشان دادند گروه B را تشکیل دادند (جدول ۲ و ۱).

جدایه‌های گیلاس استان تهران (منطقه آهار) در استفاده از فرمات، رافینوز و سالیسین با جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی متمایز کننده گروه‌های سه گانه جدایه‌های *Agrobacterium* به

دست آمده از مناطقی از ایران

Table 1. Differential phenotypic characteristics of the three groups of *Agrobacterium* strains isolated from some areas of Iran

واکنش (Characteristics)					Tests		آزمون‌ها	
جدایه‌های ایران (Iranian strains)			جدایه‌های استاندارد (Reference Strains)					
C ⁽³⁾ (13)*	B ⁽²⁾ (5)	A ⁽¹⁾ (32)	A. <i>tumefaciens</i>	A. ⁽⁴⁾ <i>vitis</i>	A. <i>rubi</i>	A. <i>larrymoorei</i>		
+	+	+	+	+	+	+	(Oxidase)	اکسیداز
NG	+	+	+	-	-	-	(3-ketolactose)	۳-کتولاکتوز
-	+	+	+	v	+	-	(Growth at 35°C)	رشد در ۳۵ درجه سانتیگراد
NG	+	+	+	+	+	+	(Growth on 2% NaCl)	تحمل نمک ۰.۲٪
K	K	K	K	K	K	K	(Litmus milk)	شیرلیتموس
NG	-	-	-	+	-	-	(Utilization of citrate)	سیترات
-	-	-	-	+	-	-	(Utilization of malonate)	اسید مالونیک
-	+	9	-	+	-	-	(Utilization of tartrate)	اسید تارتاریک
-	+	+	+	-	-	-	(Ferric ammonium citrate)	فریک آمونیوم سیترات
-	-	-	-	-	-	-	(Acid on CaCO ₃ -PDA)	اسید روی CaCO ₃ -PDA

* تعداد جدایه‌های مورد بررسی K: واکنش قلیائی NG: عدم رشد (not growth) v: متغیر
1 جدایه‌های مختلف با خصوصیات یکسان 2 نماینده انگور استان تهران (هشتگرد) 3 نماینده گیلاس استان تهران (آهار) 4 نماینده انگور قزوین

*, No of strains tested;

NG, no growth; K, alkaline; V, variable; 1, strains with similar features; 2, isolates from grapevine; 3, strain from sweet cherry; strains from grapevine, Qazvin.

گروه A (و با مشخصات *A. tumefaciens*) متفاوت بوده و توانایی رشد در ۳۵ درجه سانتیگراد،

تولید کتولاکتوز، ذوب ژلاتین، تولید لوان، استفاده از سیترات، تحمل نمک ۲٪ و تولید پلیکل از فریک آمونیوم سیترات را نداشتند. به این جدایه‌ها گروه C اطلاق گردید.

پروفیل پروتئینی

الگوی پروتئینی جدایه‌ها در یک تا شش باند میانی با هم متفاوت بود. این جدایه‌ها عمدتاً از نظر نقوش باندهای وزن ملکولی بالا به جدایه‌های استاندارد شباهت داشتند. ولیکن تفاوت‌هایی هم در بین جدایه‌ها و هم در بین نمایندگان گونه‌های مختلف اگروباکتریوم مشاهده شد (شکل ۲).

پروفیل DNA پلاسمیدی

جدایه‌های مورد مطالعه، روی ژل آگارز دارای پروفیل پلاسمیدی نسبتاً مشابهی بودند. تنها جدایه استاندارد *A. rubi* از نظر تعداد باندها متفاوت و دارای یک باند اضافی سنگین‌تر بود (شکل ۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

جدایه‌های رز و گیلاس (آهار) با وجود شباهت فنوتیپی به *A. tumefaciens* و ظهور علائم گال بر روی میزبان اصلی، علائم بیماری را روی گیاهان آزمون ظاهر نکردند. برای اطمینان از وجود پلاسمید بیماریزا در این جدایه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمر ژن بیماریزای *virD2* موجود روی پلاسمید Ti انجام شد و با تشکیل باند قوی بر روی ژل آگارز، وجود این پلاسمید اثبات گردید.

۳-۸- واکنش Box-PCR

در مجموع DNA از ۲۵ جدایه به عنوان نماینده تکثیر و الکتروفورز شده و ۱۴ جدایه دارای نقوش متفاوت قطعات DNA انتخاب و همراه با نمونه‌های استاندارد روی ژل نهایی الکتروفورز شدند (شکل ۴). با مقایسه نقوش DNA جدایه‌های ایران و سه جدایه استاندارد، درصد تشابه جدایه‌ها براساس ضریب تشابه Jaccard محاسبه گردید (شکل ۵).

براساس این نتایج، جدایه‌ها در سه گروه مجزا قرار گرفتند. گروه اول شامل *A. vitis*، گروه دوم شامل دو زیرشاخه و هر زیرشاخه شامل زوجی با حداکثر تشابه بود. اعضای این زیرشاخه را جدایه‌های به دست آمده از گیلاس منطقه آهار و بادام مشهد تشکیل دادند. گروه سوم که شامل اکثریت جدایه‌ها بود، از ۴ زیر شاخه به شرح زیر تشکیل شده بود:

(۳۸ درصد تشابه) *A. larrymoorei* (NCPBP: 4096) *A. rubi* (ICMP, 6428)
هلوی مغان، *A. tumefaciens* (ICMP: 8317) - رز اصفهان (تقریباً ۳۸ درصد تشابه)
چغندر مشهد- انگور هشتگرد (۳۲ درصد تشابه)
سیب دماوند - گیلاس اردبیل (۳۲ درصد تشابه)
مطابق دندروگرام *A. vitis* تنها با ۲۱ درصد تشابه با بقیه جدایه‌های مورد بررسی بیشترین تفاوت را نشان داد. *A. tumefaciens* استاندارد (ICMP:8317) با *A. larrymoorei* ۳۳ درصد تشابه، همین باکتری با *A. vitis* قزوین ۱۹ درصد و با *A. rubi* ۳۱ درصد تشابه نشان داد. در مقایسه *A. larrymoorei* با *A. rubi* با تشابه ۳۸ درصد بیشترین شباهت را نشان داده، در حالیکه با *A. tumefaciens* ۳۳ درصد و با *A. vitis* ۲۷ درصد شباهت داشت.
در داخل گونه *A. tumefaciens* و در بین جدایه‌های مناطق مختلف ایران، جدایه هلوی مغان با ۴۹ درصد تشابه با *A. tumefaciens* استاندارد بیشترین تشابه را دارا بوده و سپس رز اصفهان با ۳۸ درصد تشابه به این جدایه، یک شاخه را به خود اختصاص داده است. جدایه‌های انگور هشتگرد و چغندر مشهد به ترتیب با ۱۸ و ۲۷ درصد تشابه با *A. tumefaciens* استاندارد و جدایه‌های سیب و گیلاس دماوند و اردبیل با ۱۹ و ۲۷ درصد تشابه با جدایه مورد مقایسه در شاخه‌ای نسبتاً دورتر از سایرین قرار دارند. جدایه‌های به دست آمده از بادام مشهد و گیلاس استان تهران (آهار) در شاخه‌ای کاملاً مجزا از سایرین در دندروگرام قرار گرفتند (شکل ۵).

بحث

جدایه‌های *Agrobacterium* به دست آمده از محصولات و مناطق مختلف کشور به سه گروه قابل دسته‌بندی بودند. گروه اول که شامل اکثریت جدایه‌ها بود، در آزمون‌های اکسیداز، تولید ۳- کتولاکتوز، ایجاد پلیکل در فریک آمونیوم سترات، رشد در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، تحمل نمک ۲ درصد و قلیایی کردن شیر لیتموس مثبت بودند. از طرفی جدایه‌های گروه مزبور توانایی استفاده از سترات، مالونات و تارتارات را نداشتند. این گروه براساس

جدول ۲- ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *Agrobacterium* به دست آمده از گیاهان مختلف از برخی نقاط ایران

Table 2. Phenotypic features of *Agrobacterium* strains isolated from infected plants in some areas of Iran

واکنش (Characteristics)			واکنش (Characteristics)				Tests	آزمون‌ها
جدایه‌های ایران (Iranian strains)			جدایه‌های استاندارد (Reference Strains)					
C (13) ^a	B (5)	A (32)	<i>A. vitis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rubi</i>	<i>A. larrymoorei</i>		
-	-	-	-	-	-	-	(Gram reaction)	واکنش گرم
O	O	O	O	O	O	O	(O/F)	رشد هوازی-بی هوازی
+	+	+	+	+	+	+	(Catalase)	کاتالاز
+	+	+	+	+	+	+	(Nitrate reduction)	احیاء نیترات
+	+	+	+	+	+	+	(Motility)	حرکت
-	-	-	-	-	-	-	(Fluorescent pigment)	تولید رنگدانه فلورسنت
-	-	2 ^b	-	-	-	+	(H2S from cyctein)	تولید H2S از سیستئین
-	-	-	+	+	+	-	(Tween 80 hydrolysis)	توئین ۸۰
+	+	+	+	+	+	+	(Esculin hydrolysis)	هیدرولیز اسکویین
-	-	-	-	-	-	-	(Starch hydrolysis)	هیدرولیز نشاسته
NG	-	-	-	-	-	-	(Gelatin hydrolysis)	هیدرولیز ژلاتین
-	-	21	-	+	-	+	(Arginine dihydrolase)	ارژنین دی هیدرولاز
-	+	+	+	+	-	+	(Urease)	اوره از
-	-	-	-	-	-	-	(Levan formation)	تولید لوآن

Table 2 (continued)

جدول ۲- (ادامه)

-	-	-	-	-	-	-	(Indole production)	اندول
							Acid from:	تولید اسیداز
-	-	18	-	-	-	-	(meso-erythritol)	مزو-اریتریتول
+	+	+	+	+	+	+	(Adonitol)	ادونیتول
+	+	+	+	+	-	-	(Lactose)	لاکتوز
+	+	+	+	+	+	-	(D-mannitol)	دی-مانیتول
-	+	+	+	+	+	-	(Xylose)	زایلوز
-	+	+	+	+	+	-	(Rhamnose)	رامنوز
-	-	+	+	+	+	+	(Sucrose)	سوکروز
+	+	+	+	+	+	-	(Maltose)	مالتوز
-	+	+	+	+	+	-	(Sorbitol)	سوربیتول
+	+	+	+	+	+	+	(α-D-melibiose)	آلفا-دی-ملوبیوز
+	+	+	+	+	+	+	(Arabinose)	آرابینوز
-	+	+	+	+	+	+	(Trehalose)	ترهالوز
-	+	+	+	+	+	-	(Salicin)	سالیسین
-	+	+	-	+	+	-	(D-alanin)	دی-آلانین
-	+	+	+	+	-	-	(D-raffinose)	دی-رافینوز
-	-	15	-	-	+	-	(Leucine)	لوسین
+	+	+	+	+	+	+	(Cellobiose)	سلوبیوز
+	+	+	+	+	-	+	(Glycogen)	گلیکوژن
+	+	+	+	+	+	+	(Fructose)	فروکتوز
-	-	+	+	-	+	-	(Citrate)	سیترات
-	+	+	-	+	+	-	(Gluconate)	گلوکونات
-	-	+	+	+	-	+	(Glycerol)	گلیسرین

Table 2 (continued)							جدول ۲- (ادامه)	
-	-	29	V	+	-	-	(Formate)	فرمات
+	+	+	-	+	-	+	(Xylitol)	زایلیتول

a) No. of strains tested	(a) تعداد ایزوله های مورد بررسی
b) No. of strains positive	(b) تعداد جدایه های مثبت
+) Positive reaction or growth	(+) واکنش مثبت و یا رشد
-) Negative reaction or no growth	(-) واکنش منفی و یا عدم رشد
NG) No growth	(NG) عدم رشد

جدول طبقه‌بندی آگروباکتریومها (Bouzar & Jones 1995) متعلق به گونه *A. tumefaciens* می‌باشد. جدایه‌های گروه دوم که از مو هشتگرد جداسازی شده بودند تنها در چند صفت فنوتیپی مشابه *A. vitis* بوده ولی در بیشتر خصوصیات به *A. tumefaciens* شباهت داشته و می‌توان آن‌ها را به گونه اخیر نسبت داد. گروه سوم که تنها شامل جدایه‌های گیلاس استان تهران (منطقه آهار) می‌باشد با هیچیک از گونه‌های آگروباکتریوم شباهت لازم را نداشته و به نظر می‌رسد، این جدایه توانایی رشد روی اکثر محیط‌ها را از دست داده و نیازهای غذایی متفاوتی را دارا می‌باشد.

در مورد جداسازی جدایه‌های *A. tumefaciens*، کارایی محیط‌های 1A و PDA+CaCO₃ بالاتر از محیط D1 بود. از طرفی جدایه‌ها روی محیط PDA+CaCO₃ کلنی‌هایی قابل تمایز از باکتری‌های دیگر را تولید کردند.

A. tumefaciens از گال‌های طوقه و ریشه بیشتر از گال‌های هوایی قابل جداسازی بود و در جداسازی‌های صورت گرفته از نظر تعداد باکتری تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین لایه‌های درونی و بیرونی گال مشاهده نشد. این نتایج با بررسی‌های کوبرو و همکاران مطابقت داشت (Cubero et al. 1999).

گال‌های ایجاد شده توسط جدایه‌ها به دو شکل کلی بود. تعدادی با دامنه میزبانی محدود

نظیر جدایه‌های هلو، سیب و گیلاس به دست آمده از مناطق کلاردشت مازندران و آهار گالهایی با ظاهر صاف و شکل کروی که از نظر بافتی از جنس ریشه بود و جدایه‌های با دامنه میزبانی وسیع نظیر جدایه‌های بادام و شلیل مازندران کالوسهایی جدا از گیاه با بافتی نرم و اشکال بی‌قائده ایجاد کردند.

به علت عدم بیماریزایی جدایه‌های رز اصفهان و گیلاس آهار روی گیاهان آزمون، پس از جداسازی جدایه‌هایی با خصوصیات مورفولوژیکی مشابه با گونه *A. tumefaciens*، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و پرایمر ژن بیماریزایی پلاسمیدی، وجود ژنهای بیماریزایی در این جدایه‌ها به اثبات رسید. جدایه‌های انتخابی روی میزبان اولیه مایه‌زنی شده و علائم بیماری روی هر کدام از میزبانها ظاهر گردید. جدایه‌های به دست آمده از گیلاس آهار تنها در شرایط خاص، با اضافه کردن هورمون رشد قادر به ایجاد گال روی قلمه‌های گیلاس بودند.

در پروفیل پروتئینی جدایه‌ها و نمایندگان گونه‌های مختلف اگروباکتریوم، علیرغم شباهت در باندهای سنگین، تفاوتی نیز وجود داشت. جدایه‌های به دست آمده از گیلاس آهار شباهت چندانی با جدایه‌های گروههای دیگر نداشتند بطوریکه چنین تفاوت‌هایی در بررسی‌های دیگر نیز مشاهده شده است (Alarcon et al. 1987).

براساس پروفیل DNA پلاسمیدی، (به جز *A. rubi* و احتمالاً *A. larrymoorei*)، جدایه‌ها در ایجاد یک باند به هم شبیه بودند. ارتباط مشخصی بین تعداد و اندازه پلاسمید با ناحیه جغرافیایی و میزبان وجود نداشت که این نتایج با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد (Albiach & Lopez 1992).

در بررسی BOX-PCR، تنوع زیادی در سطح ژنوم، علیرغم یکسان بودن خصوصیات فنوتیپی و الگوی تغذیه‌ای، مشخص گردید، به طوریکه حداکثر درصد تشابه در داخل گونه *A. tumefaciens*، ۴۹ درصد به دست آمد. در دندروگرام حاصله جدایه‌های به دست آمده از مناطق مختلف ایران به دو دسته کلی قابل طبقه‌بندی بودند. یک گروه شامل اکثریت جدایه‌ها بوده و تعداد کمتری در گروه دیگر قرار گرفتند. به جز *A. vitis* که گروه جداگانه‌ای را تشکیل داد، اختلافات در سطح درون گونه‌ای در حد تفاوت‌های بین گونه بود، به طوریکه *A. rubi* و *A. larrymoorei* در داخل گروه مربوط به گونه *A. tumefaciens* قرار گرفتند. علت تنوع ژنتیکی را می‌توان در واردات پایه‌های درختان میوه آلوده از مناطق مختلف دنیا جستجو نمود،

بطوریکه تعدادی از پایه‌ها از آلمان و تعدادی از هلند وارد ایران شده‌اند. با قرار گرفتن آگروباکتریوم جدا شده از مو هشتگرد در گروه *A. tumefaciens* و در شاخه‌ای جدا از جدایه متعلق به *A. vitis* (جدا شده از مو آلوده در منطقه قزوین)، انتساب این باکتری به این گونه مورد تأیید قرار می‌گیرد، خصوصیات فنوتیپی و الگوی تغذیه‌ای نیز موید این نتیجه‌گیری است.

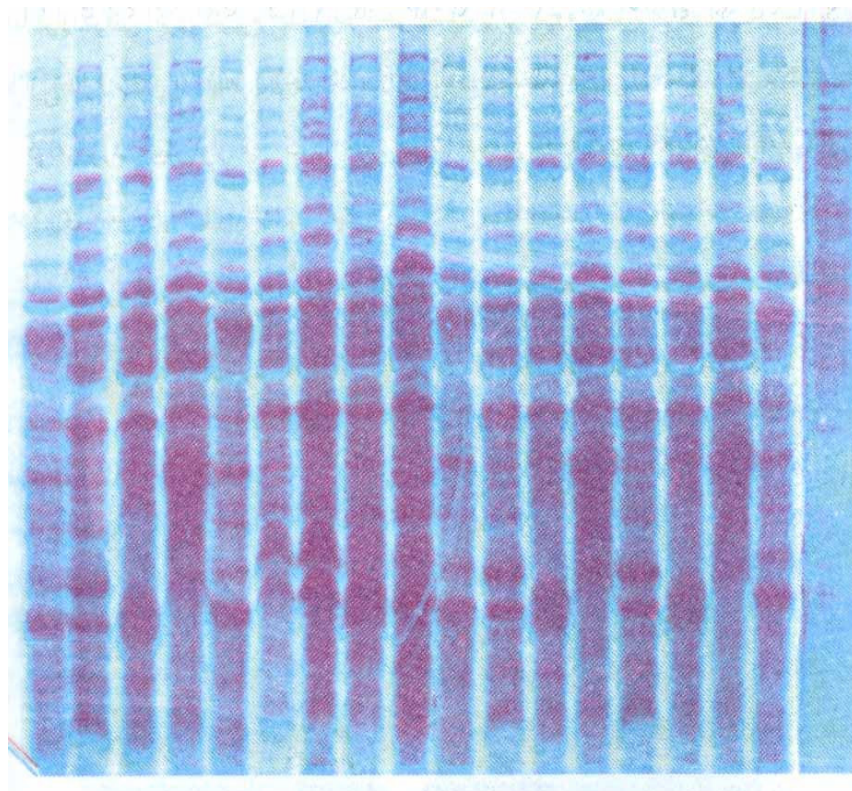


شکل ۱- اثبات بیماریزایی روی تاتوره استرامونیوم (پس از ۶ هفته).

Fig. 1. Pathogenicity test on *Datura stramonium* (after 6 weeks).

با توجه به قرار گرفتن جدایه‌های گیلاس منطقه آهار در شاخه‌ای جدا از اکثریت جدایه‌ها و نیز تفاوت این جدایه‌ها در پروفیل پروتئینی، خصوصیات فنوتیپی و بیماریزایی با سایر جدایه‌ها، احتمال می‌رود این جدایه‌ها غیرعادی بوده و در اثر تغییرات ژنتیکی وسیع و متعدد، اعم از موتاسیون و حذف یا جابجایی، دارای ویژگیهای منحصر به فرد و دامنه میزبانی محدود شده باشند.

با توجه به تشابه پروفیل پروتئینی، خصوصیات فنوتیپی و شباهت ژنی جدایه رز اصفهان با



شکل ۲- مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی استرینهای عامل گال طوقه از چپ به راست.

۶) *A.vitis*

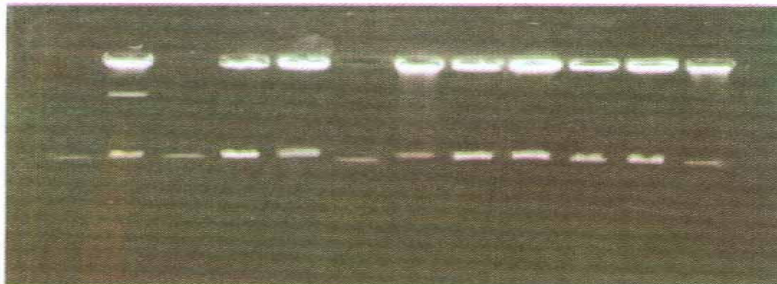
۸) *A.rubi* (ICMP,6428)

۹) *A.tumefaciens* (ICMP,8317)

۱۸) *A.tumefaciens* گیلاس منطقه آهار

Fig. 2. Comparison of the electrophoretic profiles of *Agrobacterium* strains cell proteins causing crown gall in some areas of Iran from left to right.

(6 *A.vitis* 7) *Agrobacterium larrymoorei* (NCPB 4096) 8) *A.rubi*(ICMP,6428) 9) *A.tumefaciens* (ICMP,8317) 18) *A. tumefaciens*(cherry from Ahar)



شکل ۳- الگوی پلاسمیدی استرینهای آگروباکتریوم جدا شده از مناطقی از ایران.
(۱) مارکر (*E.coli*) (۲) *A. rubi* (۳) *A. tumefaciens* (۴) *A. larrymoorei* (۵) مارکر (*E.coli*)

Fig. 3. Plasmid profile of *Agrobacterium* strains.

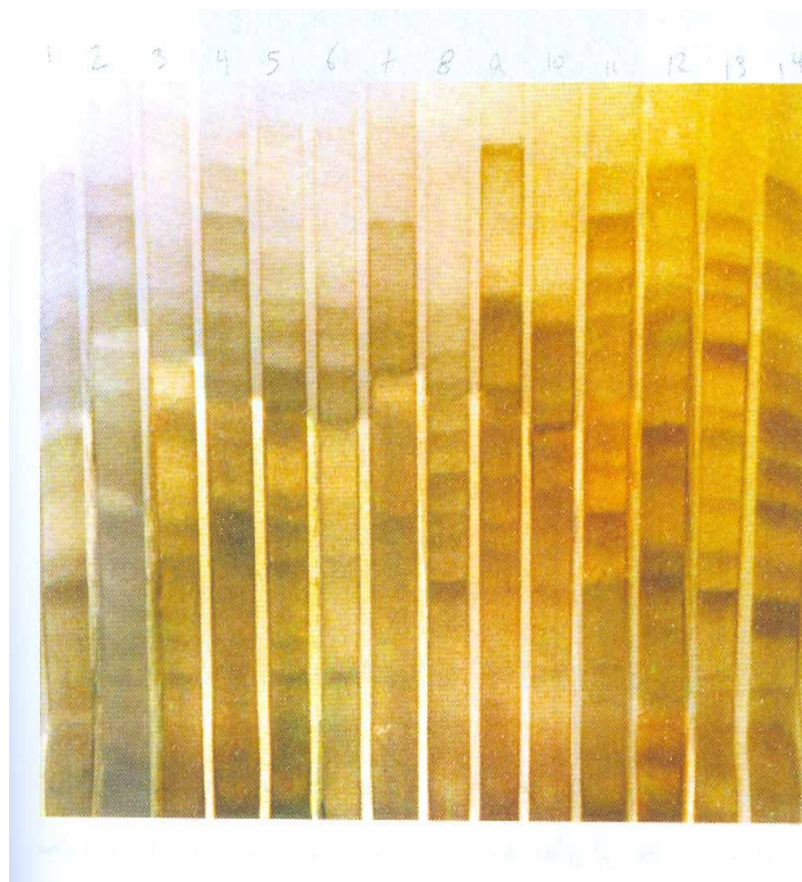
(1 (marker) *E.coli* 2 (*A.rubi* 3 (*A. tumefaciens* 4 *A. larrymoorei* (6 (*E.coli*(marker)

سایر جدایه‌ها، به خصوص جدایه استاندارد *A. tumefaciens*، محدود بودن دامنه میزبانی جدایه اخیر ممکن است در اثر تغییر یا از دست دادن ژن‌های مؤثر در دامنه میزبانی موجود روی پلاسمید Ti باشد.

تاکنون مطالعات در مورد *A. tumefaciens* به شناسایی عامل بیماری در سطح منطقه یا استان محدود بوده و فاقد بررسی فراتر در این زمینه می‌باشد. مطابق این تحقیق تشابه ۳۰-۴۰ درصدی درون گونه *A. tumefaciens* حتی در بین جدایه‌های به دست آمده از یک منطقه جغرافیایی بیانگر تفاوت ژنتیکی وسیع در مناطق مختلف کشور می‌باشد.

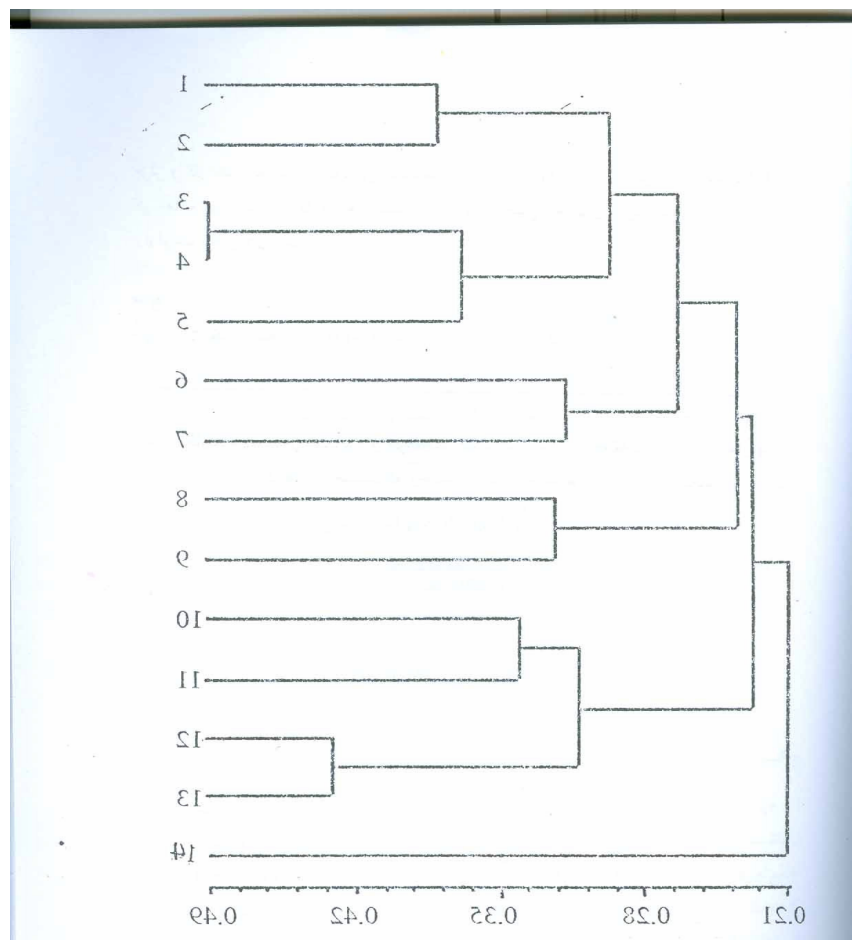
این اولین گزارش از شناسایی قطعی *A. tumefaciens* به عنوان عامل بیماری گال مو در مناطقی از ایران می‌باشد. در بررسی‌های قبلی (Ale- Yassen & Banihashemi 1993 , Fatehi *et al* 1998) تمامی جدایه‌های به دست آمده از انگور در مناطقی از کشور متعلق به گونه *A. vitis* بوده و تنها در یک مورد جدایه آگروباکتریوم بیووار I در میان سویه‌های *A. vitis* در تاکستانهای کهگیلویه و بویر احمد جداسازی و شناسایی گردیده است (Salahi *et al*, 1998).

با توجه به اینکه گروه‌بندی براساس خصوصیات فنوتیپی باکتری در تشخیص میان گونه‌ای



شکل ۴- الگوی DNA تکثیر شده جدایه‌های آگروباکتریوم با روش BOX-PCR ایزوله‌ها از چپ به راست ۱) *Agrobacterium larrymoorei* (NCPB.4096) ۲) *A. vitis* ۳) *A. rubi* (ICMP:6428) ۴) *A. tumefaciens* (ICMP:8317) و باقی جدایه‌ها *A. tumefaciens* جدا شده از میزبانها و نقاط جغرافیایی متعدد می‌باشند.

Fig. 4. PCR products generated by amplification of *Agrobacterium* DNA with BOX primer: left to right: 1) *Agrobacterium larrymoorei* (NCPB.4096) 2) *A. vitis* 3) *A. rubi* (ICMP:6428) 4) *A. tumefaciens* (ICMP:8317) and the rest of the lanes are *A. tumefaciens* strains from different hosts and different locations.



شکل ۵- دندروگرام تشابه جدایه های آگروباکتریوم بر اساس BOX-PCR.

1) *Agrobacterium larrymoorei* (NCPBP.4096) 2) *A. rubi* (ICMP:6428) 3) *A. tumefaciens* (ICMP:8317)

(4-13) *A. tumefaciens* جدا شده از میزبانها و نقاط جغرافیایی متعدد (14) *A. vitis*

Fig. 5. Similarity dendrogram of *Agrobacterium* strains based on BOX-PCR.

1) *Agrobacterium larrymoorei* (NCPBP.4096) 2) *A. rubi* (ICMP:6428)

3) *A. tumefaciens* (ICMP:8317) (4-13) *A. tumefaciens* strains from different hosts and different locations 14) *A. vitis*.

مؤثر و کارآمد بوده است، شناسایی جدایه‌ها بر این اساس واجد اهمیت بوده، و لزوم شناسایی گونه‌ها و تعیین تنوع آنها در هر منطقه در جهت تعیین روشهای موثر کنترل و پیشگیری از اولویت برخوردار است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (105-108) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: ساناز صالحی و ابوالقاسم قاسمی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی و حشمت‌اله رحیمیان دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران، ساری