جداسازی *Agrobacterium tumefaciens* از درختان سرو مبتلا به سرطان طوقه در کاشان

Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* the causal crown gall disease, from cypress in Kashan

مصطفی نیک نژاد کاظم پور*، علی روستایی و مریم رضایی

بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، ابوریحان، دانشگاه تهران ومرکز میراث فرهنگی ایران – کاشان

دریافت ۷۵/۷/۱۵ پذیرش ۱۳۸۷/۴/۵

چکیده

طی سالهای ۱۳۸۳ الی ۱۳۸٤ از ریشه درختان سرو آلوده به سرطان طوقه در باغ فین کاشان نمونه برداری شده و نمونه ها به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی عامل بیماری روی محیط های LB، IA و SC انجام گرفت. کلنی های بدست آمده روی محیط کشت LB کرم تا نقره ای رنگ بوده و کلیه جدایه ها (۱۸ جدایه) گرم منفی ، هوازی اجباری، پکتیناز ، لوان، احیاء نیترات، دی ان آز ، هیدرولیز نشاسته و اسکولین منفی و اکسیداز، کاتالاز، آرژنین دی هیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین و اوره آز مثبت بودند. تمامی جدایه‌ها از ملی زیتول، آرابینوز، مانیتول، گالاکتوز، و لاکتوز به عنوان تنها منابع کربنی استفاده کردند، درحالیکه هیچ یک از آنها قادر به استفاده از اریتریتول، ال– تارتارات ، اینوسیتول، زایلوز، سوکروز، سوربیتول و ترهالوز نبودند. کلیه جدایه ها تولید لعاب پلی ساکاریدی روی محیط های کشت حاوی کربوهیدرات نمودند. آزمون بیماریزایی روی نشاء گوجه فرنگی و برش های ریشه هویج انجام گرفت و تولید گال در این گیاهان مشاهده و از این گال ها مجددا عامل بیماری جداسازی شد. بر اساس مشخصات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، بیماریزایی و با استفاده از روش

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش زنجیره ای پلی مرآز (PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی، باکتری جدا شده از درختان سرو *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1) شناسایی شد. این اولین گزارش از همراهی *A. tumefaciens* با گال درختان سرو از ایران می باشد.

واژه‌های کلیدی: سرو، *Agrobacterium tumefaciens*، گال طوقه ، شناسایی

مقدمه

بیماری سرطان طوقه در اثر *Agrobacterium tumefaciens* از بیماریهای باکتریایی مهمی است که انتشار وسیع دارد و عامل آن به بیش از ٦٤٣ گونه از ۹۳ خانواده اعم از گیاهان علفی و چوبی دو لپه ای حمله می کند (Ogawa *et al.* 1995). خسارت اقتصادی سرطان طوقه در خزانه های پرورش نهال شدید می باشد. بسیاری از درختان میوه و زینتی از جمله سرو به سرطان طوقه حساس می باشند (Lacy and Hansen 2000). گالها روی درختان می توانند منجر به کاهش توسعه ریشه و نیروی حیاتی درخت شود. در خزانه های پرورش نهال، نهالهای آلوده به سرطان رشد شان متوقف شده و برگهای آنها حات کلروزه پیدا می کند. *A. tumefaciens* یک باکتری گرم منفی خاک است که دارای یک آرایش ژنومی غیر معمول می باشد. بدین معنی که حاوی یک کروموزوم خطی ، یک کروموزوم حلقوی و یک پلاسمید بزرگ به نام Ti – پلاسمید (Tumor initiation) است که با نسبت یکسان در باکتری وجود دارد (Zamanie 2005). بیماریزایی این باکتری با انتقال قطعه DNA ای از Ti – پلاسمید به نام (DNA – Transfer یا T – DNA) به کروموزوم سلول گیاهی صورت می گیرد. اندازه Ti – پلاسمید ها در دامنه ای بین ۲۰۰ kb تا ۸۰۰ kb قرار دارد و T – DNA حدود ۱۰ kb تا ۳۰ kb طول دارد. اغلب Ti – پلاسمید ها حاوی یک T – DNA هستند ولی چند T – DNA بر روی یک Ti – پلاسمید هم مشاهده شده است (De Costa *et al.* 2001). بر اساس توالی 16s rRNA اگروباکتریومها را جزء رایزوبیومها طبقه بندی کرده و نام *Agrobacterium* را به *Rhizobium* تغییر دادند (Young *et al.* 2001). در این طبقه بندی همچنین نام گونه *Rhizobium tumefaciens* به *R. radiobacter* تغییر یافت. علایم بیماری سرطان طوقه ابتدا در سال ۱۸۵۳ روی انگور در اروپا گزارش و اولین بار در امریکا در سال ۱۹۰۴ باکتری عامل بیماری جداسازی شد (Dixon 1984). در ایران علایم بیماری اولین بار از روی مو در ارومیه و سپس از روی

Archive of SID

www.SID.ir

چغندرقند گزارش شده است (Amani 1966, Aleyasin and Banihashemi 1993). *فاتحی* و همکاران (Fatehi *et al.* 1988) اظهار داشتند که جدایه های باکتری عامل بیماری سرطان طوقه مو جدا شده از تاکستانهای مناطق کرج و تاکستان در خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، الکتروفورز پروتئینهای سلولی، الکتروفورز DNA پلاسمیدی و حساسیت به آنتی‌بیوتیک ها هتروژن و قابل تمایز می باشند و این بیماری هم اکنون در اکثر استانهای کشور شیوع دارد. *ایرانی و قاسمی* (Irany and Ghasemi 2004) عامل سرطان طوقه و ریشه تاکستان‌های استان آذربایجان غربی را biovar 3 *A. tumefaciens* معرفی نمودند و اظهار داشتند که در موستان های ارومیه بیشترین جمعیت باکتری وجود دارد. *معرفت* (Marefat 2000) عامل بیماری گال باکتریایی ریشه و طوقه روی درختان گیلاس، آلو، هلو و شلیل را *A. tumefaciens* biovar 1 معرفی نمود. *صالحی* و همکاران (Salehie *et al.* 2004) عامل بیماری گال مو را در استان قزوین *A. vitis* و biovar 1 *A. tumefaciens* معرفی نمودند. این محققین با بررسی خصوصیات فنوتیپی، تغذیه ای و مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین جدایه های *A. tumefaciens* biovar 1 بدست آمده از مو را ناهمگن (هتروژن) گزارش نمودند و جدایه های این باکتری را در چهار گروه سرولوژیکی قرار دادند. با وجود این، *جواهری* و همکاران (Javaheri *et al.* 2000) جهت اطمینان از حضور پلاسمید Ti، آغازگر های (A-E') *vir D2* جهت تولید قطعه ۳۳۸ جفت بازی را بکار گرفتند. این آغازگرهای اختصاصی که قادر به تشخیص گونه‌های بیماریزای اگروباکتریوم بر اساس وجود خصوصیت پلاسمیدی (از نوع Ti) می‌باشد توانستند قطعه مورد نظر را تکثیر نمایند.

با توجه به خسارتزا بودن این بیماری روی درختان سرو در باغ فین کاشان و تاثیر منفی آن در فضای سبز این باغ، این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی باکتری عامل بیماری سرطان طوقه و ریشه درختان سرو در باغ فین کاشان انجام شد.

مواد و روشها

بازدید از باغات

طی سالهای ۱۳۸۳-۱۳۸۲ از درختان سرو در باغ فین کاشان بازدید به عمل آمد. در هنگام بازدیدها ، وجود غده و رشد اضافی در ناحیه طوقه و ریشه این درختان مورد بررسی قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت و از درختان دارای علایم بیماری نمونه برداری شد. نمونه ها پس از قرار دادن داخل کیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

۱- جداسازی عامل بیماریزا

تعداد ۵ نمونه از هر درخت سرو با علایم مشخص بیماری سرطان انتخاب شدند. گالها ابتدا در جریان ملایم آب شسته شده و قطعاتی حدود یک سانتی متر مربع شامل قسمت سالم و بافت آلوده مورد نظر بریده شده و بطور جداگانه توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس سه بار (هر بار ده دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بافتهای آلوده در آب پپتونه کاملا له شدند و ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. عصاره بدست آمده توسط آب مقطر سترون تا یک میلیونیوم رقیق شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط IA [شامل آرابیتول ۳/۴ گرم ، نیترات آمونیوم ۱۶/. گرم ، KH_2PO_4 ۵۴/. گرم، K_2HPO_4 ۱/۰۴ گرم ، Sodium taurocholate ۲۹/. گرم ، سولفات منیزیم ۲۵/. گرم ، آگار ۱۵ گرم ، کریستال ویوله (۱/. درصد) ۲ میلی لیتر، سلنیت سدیم (یک درصد) ۱ میلی لیتر ، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اکتیدیون] با یک میله شیشه ای خمیده پخش گردید. تشتک های پتری در دمای ۲۷ Ċ به مدت ۷ روز نگه داری شدند. کلنی های رشد یافته براساس شکل ظاهری و رنگ بررسی و کلنی های غالب انتخاب و خالص سازی شدند.

۲- آزمون اثبات بیماریزایی

برای اثبات بیماریزای جدایه ها از روش *رید* و همکاران (Ridé *et al.* 2001) استفاده شد.

۱-۲ - هویج

ریشه تازه هویج پس از چند بار شستشو و ضدعفونی (ضدعفونی سطحی به روش یاد شده در بالا و شستشو) بدون کندن پوست در ضخامت های ۵ میلیمتری در تشتک های پتری حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شدند. میران ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری ۰/۳۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، معادل تقریبی ۱×۱۰^۸ سلول باکتری (colony forming unit, cfu) در میلی لیتر روی سطح قطعات هویج قرار داده شد. تشتک ها در دمای ۲۷ °C به مدت ۱٤ روز نگه داری شدند. تولید گال در مرکز قطعات هویج به منزله اثبات بیماریزایی جدایه ها است.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۲- گوجه فرنگی

نشاء های گوجه فرنگی (۴ برگی) در سوسپانسیون باکتری با غلظت$10^8 \times 1$ cfu در میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و در گلدانهای پلاستیکی کاشته شدند. گلدانها در گلخانه در دمای ۲۷ °C به مدت ٤ هفته نگه داری شدند.

پیدایش علایم گال پس از ٤ هفته در ساقه دال بر بیماریزا بودن جدایه ها می باشد. از گال ها مجددا عامل بیماری جداسازی شد.

۳- ویژگی های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

از کلنی های ٢٤ ساعته رشد یافته هر جدایه باکتری روی محیط کشت IA برای رنگ آمیزی گرم و تاژک به روش *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001) و واکنش در مقابل KOH به روش *سالسو* و همکاران (Sulsow *et al.* 1982) استفاده شد. رشد روی محیط های Luria Berthani (LB) و سیترات مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وجود یا عدم وجود تحرک در شرایط آزمایشگاه از محیط IA بدون آگار (مایع) استفاده شد. همچنین جهت تعیین وجود یا عدم وجود رنگدانه فلورسنت از محیط King's B و رشد باکتری در دماهای ۲۷ °C و ۳۵ °C از محیط های کشت SC و IA استفاده شد (Schaad *et al.* 2001).

آزمونهای رشد هوازی و بی هوازی به روش *هیو و لایفسن* (Hugh and Leifson 1953)، اکسیداز به روش *کواکس* (Schaad *et al.* 2001) و کاتالاز به روش *دای* (Dye 1968) انجام شد. آزمون اوره آز بوسیله محیط پایه توصیه شده که به آن دو درصد اوره افزوده شد انجام شد. تولید گاز هیدرژن سولفوره (H_2S) ، ایندول و مواد احیاء کننده از ساکارز از محیط پایه آب پپتونه و از معرف های کواکس و بندیکت استفاده شد (Schaad *et al.* 2001).

برای آزمون متیل رد و تولید استوئین از محیط کشت آماده MR-VP استفاده شد (Dye 1968 , Bogs *et al.* 1998). تولید نیترات، هیدرولیز اسکولین ، هیدرولیز DNase، و آزمون لستیناز بر پایه روشهای توصیه شده *لیلیوت و استید* (Lelliot and Stead. 1987) انجام گرفت. منابع کربن با استفاده از روش تندال (Tyndalization) یا عبور از فیلترهای میلی پور (Millipore) سترون شده و به غلظت نهایی٪۰/۵ به محیط پایه اضافه شد و نتایج تا ۱۵ روز به صورت روزانه ارزیابی شد (Fahy and Hayward 1983).

۴- جداسازی پلاسمید Tip از باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

از میان ۸۸ جدایه، کلیه جدایه ها که قادر به ایجاد تومور روی هویج و ریشه گوجه فرنگی بودند برای جداسازی پلاسمید مولد تومور (Tumor inducing plasmid) انتخاب شدند (۱۸ جدایه). برای این منظور از روش *سامبرک* و همکاران (Sambrook *et al.* 2001) استفاده شد. ابتدا باکتری *A. tumefaciens* حاوی پلاسمید روی محیط LB کشت داده شد. به ۴۰۰ میکرولیتر محلول STET (ساکارز ۸٪ ، ۵ درصد تریتون X-100 ، ۱۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار، ۵ میلی لیتر Tris/HCl یک مولار، pH ۸) یک توده از کشت ۲۴ ساعته باکتری اضافه شد. سپس ۳۲ میکرولیتر پروتئیناز K (با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به آن افزوده و بمدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد . لوله ها بمدت ۶۰ ثانیه درآب جوش و سپس بلافاصله در ظرف یخ قرار داده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول روئی بآرامی به لوله دیگری منتقل و هم حجم (۴۳۲ میکرولیتر) به آن کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۱/ ۲۴) اضافه شد. لوله ها بمدت ۵ دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند و سپس قسمت روئی توسط سمپلر برداشته شد. معادل ۰/۸ حجم فاز روئی برداشته شده (۳۲۰ میکرولیتر)، ایزوپروپانل مطلق سرد اضافه گردید. جهت رسوب دادن DNA پلاسمیدی عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ انجام شد. کلاف DNA بدست آمده بوسیله اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و جهت خشک شدن در دستگاه هات پلیت در دمای ۵۵ Ċ به مدت ۲ ساعت نگه داری گردید. به رسوب حاصله (کلاف DNA) میزان۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون اضافه شد. غلظت DNA پلاسمیدی نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر، محاسبه شده، غلظت DNA محلول براساس هر واحد OD معادل ۵۰ng/µl DNA محاسبه شد. DNA پلاسمیدی تا زمان استفاده در یخچال ۴ ºC نگهداری گردید.

۵- آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

در مورد جدایه هایی که بیماریزایی آنها روی گوجه فرنگی و هویج به اثبات رسیده بود، واکنش زنجیره ای پلی مرآز جهت اثبات وجود پلاسمید بیماریزایی (Ti) صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید مولد تومور، تکثیر قطعه ای از ژنهای T-DNA با روش واکنش زنجیره ای پلی مرآز و استفاده از آغاز گرهای اختصاصی At1 (5’ ATGCCCGATCGAGCTCAAGT 3’) و At2

Archive of SID

www.SID.ir

(5’ CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA 3’) که قطعه ای به طول ۳۸۸ باز را تکثیر می‌کنند ارزیابی شد (Haas *et al.* 1995). آغازگرهای At1 و At2 قطعه ای از ژنهای T-DNA بطول ۳۸۸ باز را بعنوان الگو انتخاب و به آن اتصال می یابند. این آزمایش در داخل لوله های ۵۰۰ میکرولیتری و در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت. برای تکثیر قطعه DNA از دستگاه PCR (Mastercycler gradient) شامل ۲ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی (۲۰ پیکومول)، چهار میکرولیترdNTP ۱/. میلی مولار، شش میکرولیتر کلرور منیزیم ۲ میلی مولار ، ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت ، ۲/. واحد آنزیم *Taq* polymerase ، ۷۰/۸ میکرولیتر آب مقطر سترون دو بار تقطیر شده و پنج میکرولیتر(۱۲۰ نانوگرم) DNA الگو به هر لوله اضافه شد. به لوله ها ۲ قطره روغن معدنی اضافه گردید. لوله ها در دستگاه PCR قرار داده شدند و برنامه مخصوص حرارتی آن شامل : ۹٤ °C بمدت ٦۰ ثانیه جهت جدا شدن رشته های DNA و سپس به تعداد ۳۷ چرخه بترتیب۹٤ °C به مدت یک دقیقه، ٦۷ °C بمدت ٤۵ ثانیه، ۷۲ °C بمدت ٦۰ ثانیه اعمال شده و در پایان لوله ها در ٤ °C نگه داری شدند (Pulawska and Sobiczewski 2005). پس از پایان تکثیر در PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته و روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE (Tris/ base ۸ گرم، اسید بوریک۵/۵ گرم، EDTA ۰/۵ مولار، آب مقطر سترون۱۰۰۰ میلی‌لیتر) بار گذاری شده و سپس ژل آگارز با جریان ۱۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردید. ژل با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بمدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی و در دستگاه ژل داک تحت تابش نور ماوراء بنفش با طول موج ۳٦٤ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (Mazzola *et al.*, 1992). در هر مجموعه الکتروفورز در کنار نمونه‌های اصلی از شناساگر با وزن مولکولی bp ۱۰۰ نیز استفاده شد. جدایه مرجع *A. tumefaciens* (C58) ارسالی دکتر Ziemieenowicz از دانشگاه Jagiellonian لهستان، به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. تمام باندها که در سطح شاهد مثبت قرار گرفتند به عنوان تیمار مثبت در نظر گرفته شدند.

نتیجه

۱- جدا سازی عامل بیماری

هفت روز پس از کشت گالهای آلوده روی محیط IA ، کلنی های سفید رنگ با سطح

Archive of SID

www.SID.ir

ناصاف ظاهر شدند که اکثریت غالب کلنی های باکتریایی را شامل می شدند. از نمونه های جمع آوری شده مجموعا ۱۸ جدایه انتخاب گردید و آزمونهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بیولوژیک روی آنها انجام شد.

۲- اثبات بیماریزایی

کلیه ۱۸ جدایه در آزمون بیماریزایی روی برش های ریشه هویج و گوجه فرنگی بترتیب پس از ۱۵ و ۲۸ روز تولید علایم گال نمودند. برش های ریشه هویج و نشاء های گوجه فرنگی که توسط آب مقطر سترون مایه زنی شده بودند، هیچگونه علایمی نشان ندادند.

۳ – خصوصیات فنوتیپی

کلیه جدایه‌ها از نظر آزمون گرم، اکسیداز و پکتیناز منفی بوده و در شرایط بی‌هوازی قادر به استفاده از گلوکز نبودند. همچنین این جدایه‌ها دارای قابلیت رشد در دمای ۳۵ °C ، تحمل نمک ۵٪ ، هیدرولیز کازئین، کاتالاز، هیدرولیز آرژنین و اوره مثبت بودند. هیچ یک از جدایه‌ها روی محیط King's B ، حالت فلورسنت نداشتند. تولید اندول، لوان، ، گاز H_2S از سیستئین و پپتون، احیاء نیترات و هیدرولیز ژلاتین و توئین ۸۰ و استفاده از سیترات و ال – لیزین در همه جدایه ها منفی بود. تمامی این جدایه‌ها توانایی استفاده از ملزیتول، ال-آرابینوز، گالاکتوز، مانیتول و لاکتوز را داشته ولی قادر به استفاده از اریتریتول، زایلوز، اینوسیتول، ترهالوز، مالتوز و سوکروز نبودند (جدول ۱).

٤- الکتروفورز محصولات PCR

الکتروفورز محصولات PCR حاوی DNA با غلظت ۱۲۰ng/µl و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی At1 وAt2 رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید نشان داد که این پرایمرها قادر به تکثیر قطعه ۳۸۸ جفت بازی شدند. باندهای ایجاد شده روی ژل با باندهای شاهد مثبت (جدایه استاندارد*A. tumefaciens* C58) کاملا مطابقت داشت (شکل ۱). در این تحقیق نتایج آزمونهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای جدایه های *A. tumefaciens* بدست آمده از درختان سرو باغ فین کاشان با استفاده از روش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی مورد تائید قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه های *Agrobacterium tumefaciens* جدا شده از درختان سرو در باغ فین کاشان

Table 1 . Phenotypic characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from cypress in the Phin orchard of Kashan

ویزگی (Characteristic)	واکنش (Reaction)	ویزگی (Characteristic)	واکنش (Reaction)
واکنش گرم (Gram reaction)	–	لیستیناز (Lecithinase)	–
رشد هوازی / بی هوازی (Oxidative/Fermentative)	–	ال – تارتارات (L-tartrate)	–
تولید پیگمان های فلورسنت (Fluorescent pigment)	–	رشد روی (Growth on)	
تولید تومور روی گوجه فرنگی و هویج (Tumor on tomato and carrot)	+	Luria–Bertani agar	+
لهانیدن سیب زمینی (Potato rot)	–	SC medium	+
آرژنین دهیدرولاز (Arginine dihydrolase)	+	تحمل نمک طعام ٪۵ (Growth in 5 % NaC)	+
تولید لوان (Levan formation)	–	رشد در (Growth at)	
کاتالاز (Catalase)	+	۲۸ °C (Growth at 28°C)	+
هیدرولیز توین ۸۰ (Tween 80 hydrolysis)	–	۳۵ °C (Growth at 35°C)	+
اکسیداز (Oxidase)	+	تولید اسید از : (Acid from)	
احیاء نیترات (Nitrate reduction)	–	اریتریتول (Erythritol)	-
هیدرولیز ژلاتین (Gelatin hydrolysis)	+	ملزیتول (Melezitol)	+
هیدرولیز نشاسته (Starch hydrolysis)	–	ال-آرابینوز (L-Arabinose)	+
هیدرولیز اسکولین (Esculin hydrolysis)	–	اینوسیتول (Inositol)	–
DNase (DNase activity)	–	مانیتول (Mannitol)	+
تولید اندول (Production of Indole)	–	زایلوز (Xylose)	–
تولید H_2S از پپتون و سیستئین (H_2S from peptone and cystein)	–	تره هالوز (Trehalose)	–

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- (ادامه) Table 1. (continued)

هیدرولیز کازئین (Casein hydrolysis)	+	مالتوز (Maltose)	-
اوره آز (Urease)	+	گالاکتوز (Galactose)	+
MR / VP	-	دی-سوربیتول (D-Sorbitol)	-
استفاده از : (Utilization of)		سوکروز (Sucrose)	-
ال- لیزین (L-lysine)	-	لاکتوز (Lactose)	+
سیترات (Citrate)	-		

- : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت و یا عدم استفاده از ترکیبات (-, Negative reaction or no growth)

+ : واکنش مثبت، وجود فعالیت یا استفاده از ترکیبات (+, Positive reaction or growth)

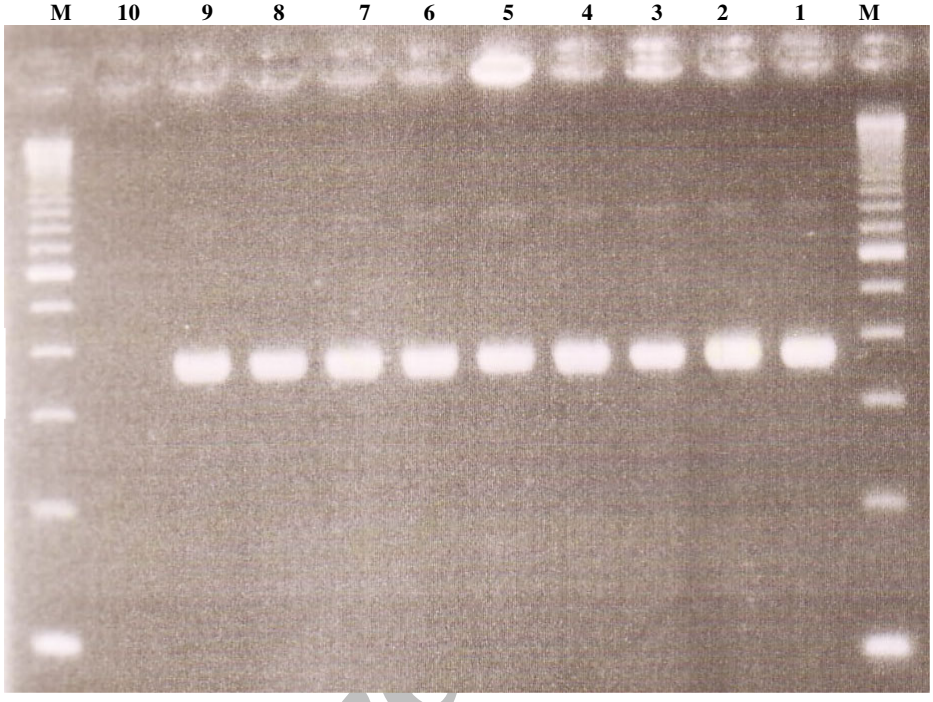
بر اساس نتایج بدست آمده از آزمونهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماریزایی و نتایج بدست آمده از روش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر DNA جدایه های حاصل از درختان سرو مبتلا به سرطان طوقه در باغ فین کاشان مشخص گردید که باکتری همراه بیماری سرطان طوقه در این باغ *A. tumefaciens* biovar 1 می باشد. نتایج بدست آمده با کارهای *برنارت و دی لی* و *رید* و همکاران (Bernaerts and De Ley. 1963 ; Ridé *et al.*, 2000) مطابقت دارد.

بحث

از ریشه درختان سرو آلوده به گال، یک باکتری گرم منفی، میله ای شکل، اکسیداز و کاتالاز مثبت جدا شد که بر اساس نتایج سایر آزمون های استاندارد باکتری شناسی به عنوان *A. tumefaciens* (biovar 1) تشخیص داده شد. همچنین از محیط های کشت انتخابی LB، IA و SC جهت شناسایی بیووار ۱ استفاده گردید. موفقیت در جداسازی به عواملی از قبیل تازه و جوان بودن گال ها و وجود باکتری در گال و همچنین غلظت باکتری در بافت و استفاده از محیط های کشت بستگی دارد (Sigee 1993). با وجود جداسازی جدایه های *A. tumefaciens* روی محیط های مورد استفاده، کارایی محیط IA در جداسازی بهتر

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تکثیر قطعه ۳۳۸ جفت باز *Agrobacterium tumefaciens* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی At1 و At2 ، چاهک های ۱ و ۱۰ شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ بازی را نشان می دهند، چاهک ۱، شاهد منفی (آب مقطر سترون)، چاهک ۲، شاهد مثبت (جدایه استاندارد *A. tumefaciens* C58)، چاهک های ۳ الی ۱۰ جدایه های *A. tumefaciens* بدست آمده از درختان سرو را شامل میشود.

Fig. 1 . Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Agrobacterium tumefaciens* with sepcefic primers At1 and At2; M, 100 bp DNA marker; lane 1 is negative control (distilled water); lane 2 is positive control (*A. tumefaciens,* C58) showing the amplification of the fragment approximately 338 bp in length; lanes 2 to 10, strains of *A. tumefaciens* isolated from cypress.

از محیط‌های LB و SC بود. کشت عصاره گال ریشه درختان سرو روی محیط کشت اختصاصی IA ، به عنوان بهترین روش در جداسازی *A. tumefaciens* (biovar 1) تشخیص داده

Archive

www.SID.ir

شد. در این روش طی مدت ۴ روز پس از کشت عصاره روی محیط کشت IA ، پرگنه های با مشخصه (biovar 1) *A. tumefaciens* با حاشیه سفید و مرکز قهوه ای رشد می کنند. *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001) استفاده از محیط کشت IA را به عنوان یک روش سریع در جداسازی و تشخیص (biovar 1) *A. tumefaciens* معرفی کرده اند. میزان آلودگی درختان سرو به سرطان گال در باغ فین کاشان شدید بود بطوریکه کلیه درختان سرو علایم گال را در طوقه و ریشه داشتند. در این تحقیق مشخص گردید که علایم بیماری گال روی درختان سرو در باغ فین کاشان که یک منطقه نسبتا گرم می باشد بروز می نماید. نیش حشرات و سایر موجودات خاکزی و همچنین عملیات زراعی می تواند سبب بروز زخم در طوقه و ریشه گیاهان شده و موجب بروز و گسترش بیماری شود. تحقیقات *تاربا و گودمن* (Tarbah and Goodman 1986) نشان می دهد که سرما و زخم ناشی از یخ زدگی در بروز بیماری سرطان طوقه و ریشه مو نقش موثری دارد. عوامل متعددی از جمله پلاسمید Ti، زمینه کروموزومی باکتری و تنوع ژنتیکی میزبان در بروز بیماری نقش دارند (Zhu *et al.* 2000, Knauf *et al.* 1982). با وجود این در این تحقیق کلیه جدایه های مولد گال روی درختان سرو در باغ فین کاشان *A. tumefaciens* (biovar 1) تشخیص داده شدند. بنابراین لزوم شناسایی گونه ها و تنوع آنها روی درختان سرو در سایر مناطق کشور در جهت تعیین روشهای کنترل موثر است . آزمون PCR در مقایسه با سایر روش های سنتی شامل کشت، جداسازی و خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نتایج مشابهی ارائه می دهد باوجود این در صورت وجود امکانات لازم، جهت بالا بردن حساسیت PCR و تفکیک سلولهای زنده باکتری استفاده از روش Bio PCR توصیه می گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (143-140) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: مصطفی نیک نژاد کاظم پور، علی روستایی و مریم رضایی بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، ابوریحان، دانشگاه تهران ومرکز میراث فرهنگی ایران، کاشان

Archive of SID

www.SID.ir