ارتباط فنوتیپی و ژنتیکی سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از نیشکر، درختان میوه هسته‌دار و گندم*

مریم موسیوند[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۲]** و مسعود شمس‌بخش[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۵/۲۶)

چکیده

خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، الگوی پروتئین‌های سلولی و الگوی ژنتیکی حاصل از rep-PCR در جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بیماری نوار قرمز نیشکر با جدایه‌های عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، جدایه‌های عامل بلایت باکتریایی گندم و جدایه مولد بیماری لکه زاویه‌ای ختمی مورد بررسی قرار گرفت. همه جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* خصوصیات بیوشیمیایی مشابهی داشتند. از نظر هیدرولیز توئین ۸۰، تولید لوان از سوکروز و تولید سیرینگومایسین میان جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* عامل نوار قرمز نیشکر تنوع وجود داشت. مقایسه الگوی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها مشخص نمود که جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* عامل نوار قرمز نیشکر شباهت بسیار بالایی به هم داشته و در چندین باند پروتئینی با دیگر جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* تفاوت دارند. الگوی پروتئینی جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و جدایه‌های عامل بلایت گندم بسیار مشابه و غیر قابل تفکیک بودند. تنوع درون جدایه‌های مختلف *P. s.* pv. *syringae* براساس اثر انگشت ژنتیکی حاصل از rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX A1R، ERIC1R و ERIC2قابل ملاحظه بود. بررسی حاضر نشان داد که از نظر ژنتیکی جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* عامل بیماری نوار قرمز نیشکر در مقایسه با جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار، بلایت باکتریایی گندم و لکه زاویه‌ای ختمی گروه جداگانه‌ای را تشکیل می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: rep-PCR، بیماری نوار قرمز، بلایت، شانکر، ایران

مقدمه

Pseudomonas syringae pv.*syringae* (*Pss*) در میان سایر پاتووارهای گونه از نظر توانایی ایجاد بیماری در ۱۸۰ گونه گیاهی بی‌نظیر است (Liu *et al*. 1999). اعضای مهم خانواده‌های Fabaceae، Poaceae، Rosaceae، Oleaceae و Rutaceae به‌عنوان میزبان پاتووار *P. s.* pv. *syringae* گزارش شده‌اند (Hirano & Upper, 1990). با وجود این به‌نظر می‌رسد که پاتووار*Pss* نسبت به میزبان‌های خود اختصاصی است. تشخیص نژاد برای پاتووار *P.s.* pv. *glycinea* انعکاس‌دهنده تنوع جدایه‌های درون یک پاتووار در

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rahimianh@gmail.com

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری

Archive of SID

www.SID.ir

تعامل با ارقام مختلف یک گونه میزبانی است (Hirano & Uppers 1990).

از عمده‌ترین بیماری‌های ناشی از پاتووار*Pss* در ایران می‌توان به شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار (Bahar *et al.* 1983)، بلایت باکتریایی گندم و جو (Rahimian 1989) و نوار قرمز نیشکر (Rahimian 1995, 2004) اشاره نمود.

بیماری نوار قرمز نیشکر اولین بار از ژاپن گزارش وعامل آن پاتووار *Pss* شناسایی گردید (Yano *et al.* 1986). علائم بیماری شامل لکه‌های بین رگ‌برگی، خطی و گاه بیضوی، قرمز رنگ و با طول‌های متفاوت است. وسط این لکه‌ها متعاقباً به رنگ سفید یا سفید مایل به کرم در می‌آید. علائم بیماری روی برگ‌های جوان وپیر قابل مشاهده می‌باشد. عرض لکه‌ها معمولاً ۲-۱ میلی‌متر و طول آنها ۲ تا بیش از ۲۰۰ میلی‌متر می‌باشد (Rahimian 1995, 2004). براساس مطالعات انجام شده مشخص شده که استرین‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر از نظر بیماری‌زایی (Rahimian 2000, 2004)، الگوی پروتئین‌های سلولی (Rahimian 1995) و هم‌چنین ساختمان سیرینگومایسین خود (Fukuchi *et al.* 1990) با استرین‌های*Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت باکتریایی گندم و جو متفاوت می‌باشند.

خانواده‌هایی از توالی‌های تکراری DNA درون ژنوم گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی و بعضی از گرم مثبت‌ها پراکنده شده‌اند. سه خانواده از توالی‌های مذکور که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند توالی‌های REP(repetitive extragenic palindromic)، ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) و BOX می‌باشند (Hulton *et al.* 1991). الگوی ژنتیکی به‌دست آمده با این روش‌ها به‌عنوان یک بارکد برای هر استرین خاص باکتریایی عمل می‌نماید. مطالعات انجام شده نشان داده است که REP-PCR و ERIC-PCR روش‌های بسیار کارامدی بوده و قادرند در سطح پاتووار یا سطوح تاکسونومیکی زیر آن، میان باکتری‌های بیمارگر تفاوت قائل شوند (Little *et al.* 1998). بررسی‌های انجام شده نشان داده است که جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر با جدایه‌های *Pss* بیماری‌زا روی درختان میوه هسته‌دار, گندم و جو از نظر بیماری‌زایی، دامنه میزبانی، الگوی پروتئین‌های سلولی و ساختمان سیرینگومایسین متفاوت می‌باشند (Fukuchi *et al.* 1990, Rahimian 2000, 2004). جهت تعیین دقیق‌تر موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر، بررسی جدایه‌های مذکور از نظر ژنتیکی ضروری به‌نظر می‌رسد. بررسی حاضر به تعیین رابطه دقیق تر تاکسونومیکی جدایه‌های *Pss* عامل نوار قرمز نیشکر با جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت برگی گندم با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (ERIC-PCR و BOX-PCR) پرداخته است که از نتایج حاصل از آن می‌توان در تحقیقات اپیدمیولوژی مرتبط با *Pss* در میزبان‌های مختلف، بقای اپی‌فیتی و استراتژی کنترل بیماری استفاده نمود.

روش بررسی

در آبان و بهمن ماه سال ۱۳۸۲، بیش از ٦٠ نمونه برگی مشکوک به بیماری نوار قرمز از گیاهان نیشکر استان مازندران (مزارع واقع در بهنمیر، کیاکلا، جویبار و لالیم) جمع‌آوری شد.

برگ‌های آلوده، ابتدا زیر جریان آب وسپس دو بار با آب مقطر سترون شسته شد. قطعاتی از حد فاصل قسمت آلوده و سالم برگ که با قیچی سترون برش داده شده بود، در داخل هاون سترون حاوی چند قطره آب مقطر سترون قرار گرفت. قطعات مذکور در داخل هاون له شدند. یک قطره از سوسپانسیون حاصله روی محیط Nutrient Agar Sucrose (NAS) (ساکارز ۵% و آگار مغذی ۲۳g/L) کشت داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲٦±۲ °C به‌مدت دو تا سه روز نگه‌داری شدند. تک کلنی‌های ظاهر شده روی محیط KB یاNAS کشت داده شدند (Rahimian 1995). هم‌چنین جدایه‌های مربوط به درختان میوه هسته‌دار، گندم و

Archive of SID

جو و جدایه‌های ختمی برای بررسی مقایسه‌ای با کشت و انتخاب تک کلنی روی NAS خالص گردیدند. بیماری‌زایی جدایه‌های *Pss* نیشکر روی گیاهان نیشکر، گندم، هلو و ختمی بررسی گردید. به این منظور از ٦ جدایه نیشکر (نماینده جدایه‌های ٦ مزرعه مورد مطالعه)، پنج جدایه از درختان میوه هسته‌دار (اهدایی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور)، یک جدایه گندم (اهدایی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور) و یک جدایه ختمی (موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه مازندران) استفاده گردید.

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها

ویژگی‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های به‌دست آمده از نیشکر، درختان میوه هسته‌دار و گندم براساس آزمون‌های متداول جهت شناسایی پاتووار*Pss* مورد بررسی قرار گرفت. واکنش گرم با استفاده از روش حلالیت در KOH ٣ % (Suslow *et al*. 1982) و رنگ‌امیزی گرم (Schaad *et al*. 2001) انجام شد. آزمون فوق حساسیت در توتون به‌روش *کلمنت* و همکاران (Klement *et al*. 1964) و آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره‌ای از کلونی روی کاغذ صافی آغشته به محلول ٠/١ درصد تترامتیل پارافنیلین دی آمین دی هیدروکلراید صورت گرفت (Schaad *et al*. 2001, Kovacs 1956).آزمون آرجی نین دهیدرولاز با استفاده از روش *تورنلی* (Schaad *et al*. 2001, Thornley 1960) و آزمون متیل رد، تولید استوئین، هیدرولیز نشاسته و اثر روی شیر لیتموس با روش *کوان* (Cowan 1974) انجام شد. آزمون هیدرولیز توئین ٨٠ بر اساس روش *میثاقی و گروگان* (Misaghi & Grogan 1970) و آزمون تولید لسیتیناز با استفاده از روش *شاد و همکاران* (Schaad *et al*. 2001) صورت پذیرفت.

آزمون‌های تولید لوان و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین، اسکولین، آربوتین و کازئین و نیزآزمون‌های کاتالاز، تولید گاز H2S از سیستئین، تولید ایندول، تولید مواد احیا کننده از ساکارز، احیای نیترات، تولید اوره آز، رشد در NaCl پنج درصد، رشد در دمای ٣٧ °C و تولید هسته یخ به‌روش *شاد و همکاران* (Schaad *et al*. 2001) انجام شد. تولید سیرینگومایسین با استفاده از یک جدایه از *Geotrichum candidum* Link exFr و روش *گراس و دی وی* (Gross & DeVey 1977) انجام گرفت.

در آزمون‌های استفاده از اسیدهای آمینه و آلی و تولید اسید از قندهای مختلف از محیط پایه آیر (Ayer) و غلظت‌های ١% هر قند و٠/٢% اسیدهای آمینه آلی استفاده شد (Schaad *et al*. 2001).

الکتروفورز پروتئین

مقایسه نقوش پروتئین‌های سلولی جدایه‌های ساپروفیت و بیماری‌زای جدا شده از نیشکر، نماینده جدایه‌های بیماری‌زای گندم و نماینده جدایه‌های بیماری‌زای درختان میوه هسته‌دار با الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) درسیستم نا پیوسته لملی (Laemmli 1970) انجام شد. جدایه‌ها روی محیط NAS کشت داده شدند و بعد از ٢٤ ساعت سوسپانسیونی از آنها در یک میلی‌لیتر از آب مقطر سترون تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ٦٠٠ نانومتر برابر با یک تنظیم شد. مقدار ٥٠ میکرولیتر ٢- مرکاپتواتانول به ٩٥٠ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد. جهت تهیه بافر نمونه ٠/٧٦ گرم تریس، ١٠ میلی‌لیتر گلیسرول، یک گرم SDS و ٠/٥ میلی‌گرم برم فنل بلو در ٤٠ میلی‌لیتر آب مقطر حل و pH محلول به ٦/٨ تنظیم گردید. حجم محلول با استفاده از آب مقطر به ١٠٠ میلی‌لیتر رسانده شد. به‌منظور پاره کردن سلول‌ها، معادل ٠/٢ حجم سوسپانسیون (٢٠٠ میکرولیتر) از بافر نمونه به آنها اضافه شد و به‌مدت پنج دقیقه در یک حمام آب گرم قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ١٠ دقیقه در g ١٣٠٠٠x میان‌گریز شده و رونشین حاصل جدا و به‌عنوان نمونه پروتئین در چاهک‌های ژل اکریل آمید ریخته شد. الکتروفورز در جریان ثابت ٢٠

www.SID.ir

میلی‌آمپر و ولتاژ ۷۰ ولت انجام و با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل پایان پذیرفت. جهت رنگ‌امیزی، ژل در محلول حاوی ۰/۱۲درصد کوماسی بلو،۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک به‌مدت۳-۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. به‌منظور رنگبری و تا زمان وضوح باندهای پروتئینی، ژل در محلول۵۰ درصد متانول - ۱۰ درصد اسید استیک قرار داده شد. سپس ژل در محلول ۷ درصد اسید استیک نگه‌داری و از آن عکس گرفته شد (Ausubel *et al*. 1987).

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA به‌روش لیز قلیایی انجام شد. دی ان آ ژنومی استخراج شده در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و مقدار DNA به‌صورت تقریبی تخمین زده شد. مقادیر مناسب از DNA ژنومی جهت انجام PCR تعیین شد (Sambrook *et al*. 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنشrep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX A1R، ERIC1R و ERIC2 براساس روش ورسالوویک و همکاران (Versalovic *et al*. 1991) انجام شد. در ERIC-PCR، از آغازگر ERIC 1R با توالی 5´- ATG TAA GCT CCT GGG -3´ وآغازگر ERIC2 با توالی 5´- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3´ و درBOX-PCR از آغازگر BOXA 1R با توالی 5-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3´ استفاده گردید (Schaad *et al*. 2001).

برنامه تکثیر DNA با واسرشت سازی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۵°C به‌مدت هفت دقیقه شروع و سپس ۳۳ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA در دمای ۵۱°C (برای آغازگرهای ERIC 1R و ERIC 2) و دمای ۵۳°C (برای آغازگر BOXA 1R) به‌مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۶۵°C به‌مدت شش دقیقه انجام شده ودر آخر بسط نهایی(Final extention) در ۶۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت (Versalovic *et al*. 1991).

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر BIOMETRA انجام گرفت. الکتروفورز محصولات حاصل از PCR، در ژل آگارز یک درصد به همراه یک مارکر مولکولی (Kb ۲/۱-۰/۱، شرکت Fermentas) انجام شد. بافرمورد استفاده در ژل و در محفظه الکتروفورز، TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم اسید بوریک و ۰/۳۷ گرم EDTA در یک لیتر آب مقطر) بود (Sambrook *et al*. 1989). مواد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سینا ژن (تهران، CinaGene) تهیه گردید. ژل آگارز با اتیدیوم برماید (محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌امیزی و ازآن عکس‌برداری شد. براساس وجود یا عدم وجود باند و فاصله باند از چاهک و با استفاده از نرم افزارSPSS و ضریب Simple matching تشابه جدایه‌ها محاسبه و دندروگرام ترسیم گردید.

نتیجه

نمونه‌برداری و جدا سازی

از برگ‌های نیشکر دارای علائم بیماری نوار قرمز، ۵۰ جدایه با خصوصیات مشابه پاتووار *Pss* جدا شد. کلنی‌ها روی محیط NAS، به رنگ روشن، کروی، گنبدی شکل و لعاب دار مشاهده شدند. بعد از چهار روز رشد در دمای ۲۸°C-۲۵، قطر کلنی‌ها۴-۳ میلی‌متر بود. این کلنی‌ها روی محیط KB تولید رنگدانه فلورسنت نموده و دارای حاشیه صاف تا کمی مضرس و به رنگ کرم روشن بودند. جدایه‌های عامل بیماری نوار قرمز نیشکر پس از خالص‌سازی جهت اثبات بیماری‌زایی به برگ‌های نیشکر مایه زنی شدند. جدایه‌ها ظرف یک هفته علایم بیماری نوار قرمز را در نیشکر ایجاد نمودند. این جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی گندم، ختمی و هلو نبودند.

Archive of SID

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های *Pss* نیشکر، درختان میوه هسته‌دار و گندم ویژگی‌های بیوشیمیایی تقریبا مشابهی داشتند، ولی جدایه‌های *Pss* نیشکر بر خلاف سایرجدایه‌ها, قادر به استفاده از D- تارتارات بودند. هم‌چنین جدایه‌های *Pss* نیشکر در مقایسه با جدایه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار و گندم با سرعت کمتری تولید لوان نموده و میزان تحدب کلنی‌های آنها در مقایسه با جدایه‌های بیماری‌زا در درختان میوه هسته‌دار و گندم کمتر بود. برخی از جدایه‌ها در مقایسه با بقیه با سرعت کمتری تولید لوان نمودند. تمام جدایه‌های مولد نوار قرمز نیشکر قادر به هیدرولیز توئین ۸۰ بودند، ولی تعدادی ازجدایه‌ها به کندی این چربی را هیدرولیز کردند. هم‌چنین گروهی از جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر در مقایسه با سایر جدایه‌ها، هاله بازدارندگی رشد بزرگ‌تری را در قارچ *Geotrichum canidum* تولید نمودند. نتایج بررسی ویژگی‌های جدایه‌ها درجدول یک آمده است. به‌نظر می‌رسد که جدایه‌های عامل بیماری نوار قرمز نیشکر تفاوت‌های کمی ۸ در ویژگی‌های فنوتیپی با هم دارند.

الگوی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها

جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر (جدایه‌های نماینده از ٦ ناحیه در استان مازندران) الگوی پروتئینی مشابهی داشته و در چندین باند پروتئینی با جدایه PsM1 (نماینده جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار) و جدایه PsG1 (نماینده جدایه‌های *Pss* عامل بلایت باکتریایی گندم) متفاوت بودند. هم‌چنین جدایه‌های PsM1 و PsG1 علی‌رغم تفاوت‌های جزئی، الگوی پروتئینی مشابهی داشتند (شکل ۱).

انگشت‌نگاری ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ERIC-PCR

دی ان آ ژنومی جدایه‌های*Pss* نیشکر، درختان میوه هسته‌دار، گندم و ختمی با روش ERIC-PCR وآغازگرERIC1R تکثیر گردید (شکل ژل نشان داده نشده است). تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ٦ تا۱۱ باند و محدوده اندازه باندها بین ٦۹۰bp تا ۵۱٤۸bp بود. نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌های*Pss* مورد بررسی در سه گروه قرار می‌گیرند:

گروه ۱: نماینده جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار،

گروه ۲: نماینده جدایه‌های *Pss* عامل نوارقرمز نیشکر،

گروه ۳: نماینده جدایه‌های *Pss* گندم و جدایه *Pss* ختمی خواب‌آلود (شکل۲).

الگوی اثر قطعات حاصل از ERIC-PCR و آغازگرERIC2 برای DNA ژنومی جدایه‌های *Pss* نیشکر، درختان میوه هسته‌دار، گندم و ختمی در شکل ۳ نشان داده شده است. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ٤ تا۹ باند و محدوده اندازه باندها بین٥٦ bp تا ۵۱٤۸bp بود. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای مشخص نمود که جدایه‌های*Pss* در دو گروه قرار می‌گیرند.

گروه یک شامل نماینده جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار، نماینده جدایه‌های*Pss* گندم و جدایه *Pss* ختمی و گروه دو شامل نماینده جدایه‌های *Pss* عامل نوارقرمز نیشکر (شکل ٤).

انگشت‌نگاری ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR

دی ان آ ژنومی جدایه‌های*Pss* نیشکر، درختان میوه هسته‌دار، گندم و ختمی با آغازگرBOXA 1R تکثیر گردید. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ٦ تا ۷ باند و محدوده اندازه آنها بین ۱۵۰bp تا ۳۵۰۷bp بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌ها در چهار گروه به شرح زیر قرار می‌گیرند:

گروه ۱: نماینده جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار

گروه ۲: جدایه *Pss* ختمی خواب‌آلود،

Archive of SID

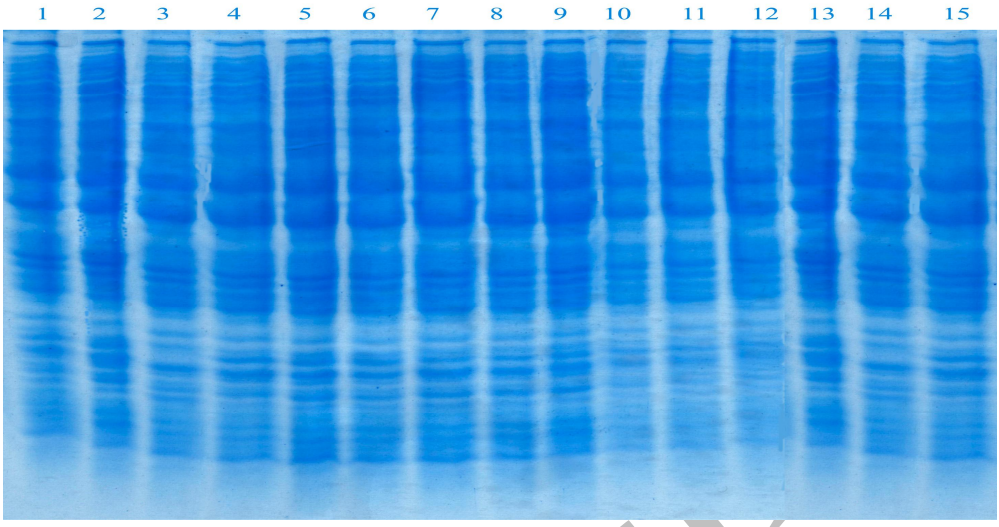
www.SID.ir

جدول ۱. ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از نیشکر، درختان میوه هسته‌دارو گندم

Table 1.Phenotypic traits of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from sugarcane, stone fruit trees and wheat.

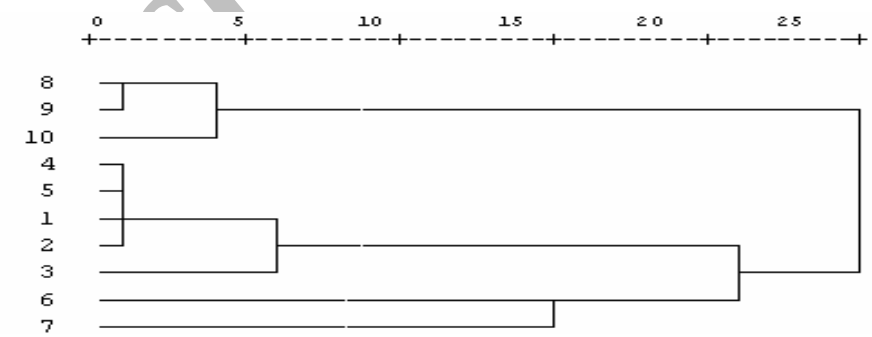
ویژگی(Characteristics)	جدایه‌های نیشکر Isolates from sugarcane	جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار Isolates from stone fruits	جدایه‌های گندم Isolates from wheat
واکنش گرم (Gram reaction)	-	-	-
آرجی نین دی هیدرولیز و اکسیداز (Oxidase و Arginine dihydrolase)	-	-	-
لوان (Levan)	+	+	+
فوق حساسیت روی توتون (Tobacco hypersensitivity)	+	+	+
لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی (Potato rot)	-	-	-
هیدرولیز اسکولین، کازئین، ژلاتین، آربوتین و توئین ۸۰ (Hydrolysis of esculin, casein, gelatin, arbutin and Tween 80)	+	+	+
تولید مواد احیا کننده از سوکرز (Reducing sugars from sucrose)	+	+	+
تولید H_2S از سیستین(H_2S from cysteine)	-	-	-
احیای نیترات (Nitrate reduction)	-	-	-
تولید اندول و استوئین (Production of indole and acetoin)	-	-	-
هیدرولیزنشاسته (Hydrolysis of starch)	-	-	-
لسیتیناز (Lecithinase)	-	-	-
اوره آز (Urease)	+	+	+
اثر بر شیر لیتموس (Litmus milk)	قلیایی(A)	قلیایی (A)	قلیایی (A)
کاتالاز (Catalase)	+	+	+
تولید سیرینگومایسین (Syringomycine production)	+	+	+
رشد در NaCl ۵% (Growth in 5%NaCl)	+	+	+
رشد در ۳۷°C (37^0C)	-	-	-
تولید اسید از گلوکز، فروکتوز، زایلوز، گالاکتوز، ملی بیوز، رافینوز، سوکروز، مانوز، مانیتول، سوربیتول، ریبوز، اریتریتول، مالتوز و آرابینوز (Acid from glucose, fructose, xylose, galactose, melibiose, raffinose, sucrose, mannose, mannitol, sorbitol, erythritol, ribose, maltose and arabinose).	+	+	+
ترهالوز و آدنیتول (Trehalose, adonitol)	-	-	-
استفاده از ال-تارتارات Utilization of (L-tartarate)	-	-	-
د-تارتارات (D-tartarate)	+	-	-
استفاده از لاکتات، ۲-کتوگلوتارات و سیترات (lactate ,2- Ketoglotarate and citrate)	+	+	+

Archive of SID



شکل ۱. مقایسه نقوش پروتئینی جدایه‌های Pss بیماری‌زا در نیشکر، درختان میوه هسته‌دار و گندم.
ستون۱. جدایه Pss ساپروفیت به‌دست آمده از برگ‌های نیشکر؛ ستون ۲. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss درختان میوه هسته‌دار؛ ستون ۳و ٤. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss نیشکر(مزرعه شماره ۱)؛ ستون ٥ و ٦. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss نیشکر(مزرعه شماره ۲)؛ ستون۷ و ۱۰. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss نیشکر(مزرعه شماره ۳)؛ ستون ۸، ۹، ١٤ و ١٥، نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss نیشکر(مزرعه شماره ٥ و ٦)؛ ستون ۱۱ و ۱۲. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pssنیشکر (مزرعه شماره ٤)؛ ستون ۱۳. نماینده جدایه‌های بیماری‌زای Pss گندم.

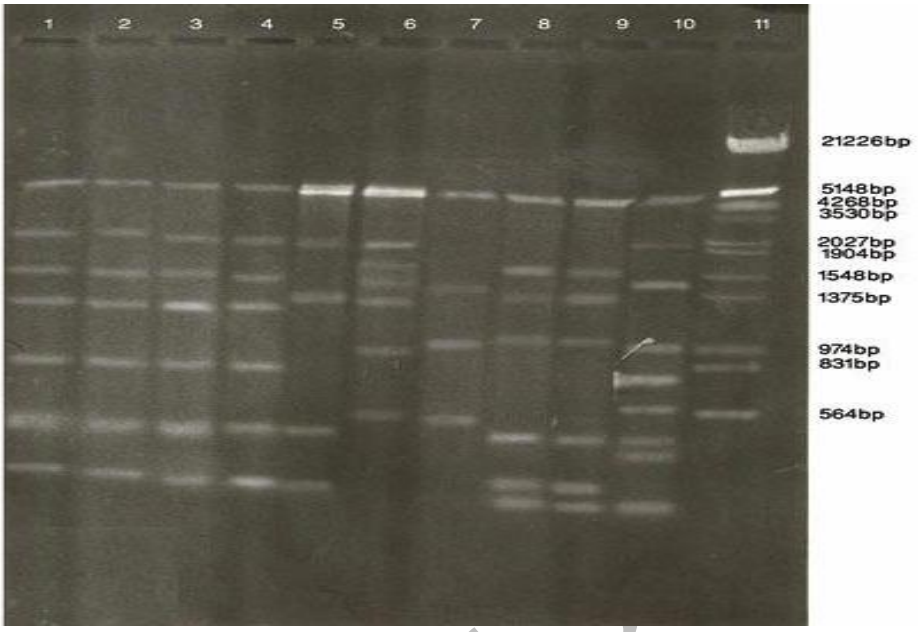
Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains pathogenic on sugarcane, stone fruit trees and wheat.
Saprophytic strain Pss isolated from sugarcane leaves (Lane1), Pss strain from a stone fruit tree (Lane 2). Pathogenic Pss strains of sugarcane from field number 1 (Lanes 3and 4), pathogenic Pss strains of sugarcane from field number 2 (Lanes 5 and 6), pathogenic Pss strains of sugarcane from field number 3 (Lanes 7and10), pathogenic Pss strains of sugarcane from field number 4(Lanes 11 and 12), pathogenic Pss strains of sugarcane from field number 5 and 6 (Lanes 8, 9, 14and 15), pathogenic Pss strain from wheat (Lane 13).



شکل ۲. دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل ازERIC-PCR (آغازگر ERIC1R) در جدایه‌های نماینده *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بیماری‌زا در نیشکر(۱، ۲، ۳، ٤ و ٥)، درختان میوه هسته‌دار(۸، ۹ و۱۰)، گندم (٦) و ختمی خواب‌آلود(۷).

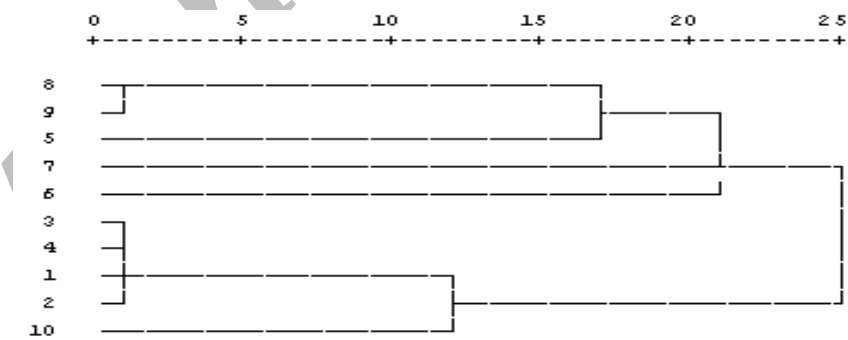
Fig. 2. Dendrogram of the ERIC –PCR generated fingerprints (ERIC 1R primer) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates pathogenic on sugarcane (Lanes 1, 2, 3, 4 and 5), stone fruit trees (Lanes 8, 9 and 10), wheat (Lane 6) and sleepy mallow (Lane 7).

www.SID.ir



شکل۳. اثر انگشت ژنتیکی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در ERIC-PCR با آغازگر ERIC2؛ ستون ۱، ۲، ۳ و ٤. نماینده جدایه‌های Pss بیماری‌زا در نیشکر. ستون ٥. جدایه Pss ختمی خواب‌آلود. ستون ٦. نماینده جدایه‌های Pss گندم. ستون ۷، ۸ و ۹. نماینده جدایه‌های Pss درختان میوه هسته‌دار (به ترتیب از گیلاس، هلو و زردآلو). ستون۱۰. جدایه اپی فیت Pss جدا شده از نیشکر. ستون۱۱. استاندارد جرم مولکولی (DNA- Ladder).

Fig. 3. ERIC-PCR fingerprinting of genomic DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolats (ERIC2 primer).
Pss strains causing sugarcane red streak disease (Lanes 1, 2, 3 and 4), an epiphytic strain of Pss from sugarcane (Lane 10), Pss strain from sleepy mallow (Lane 5), Pss strain from wheat (Lane 6), Pss strains from stone fruit trees (Lanes7, 8 and 9).DNA molecular size marker (Lane 11).



شکل٤. دندروگرام الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR (آغازگر ERIC2) در جدایه‌های نماینده Pss بیماری‌زا در نیشکر(۱، ۲، ۳ و ٤)، درختان میوه هسته‌دار(۷، ۸ و ۹)، گندم (٦)، ختمی خواب‌آلود(٥)، ایزوله اپی فیت Pss جدا شده از نیشکر (۱۰).

Fig. 4. Dendrogram of the ERIC –PCR generated fingerprints (ERIC2 primer) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic on sugarcane (1, 2, 3 and 4) , stone fruit trees (7, 8 and 9), wheat (6) , sleepy mallow (5) and an epiphytic isolate of Pss from sugarcane (10).

www.SID.ir

گروه ۳: نماینده جدایه‌های *Pss* عامل نوارقرمز نیشکر،
گروه ٤: نماینده جدایه‌های *Pss* گندم و جدایه‌*Pss* اپی فیت نیشکر (شکل ٥).

آنالیز داده‌های حاصل از آغازگرهای ERICIR، ERIC2 و BOXA1R

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از ERIC-PCR و BOX-PCR و هر سه آغازگر (ERICIR، ERIC2 و BOXA1R) نشان داد که جدایه‌های *Pss* نیشکر، درختان میوه هسته‌دار، ختمی و گندم، در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه یک شامل نماینده جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار، جدایه *Pss* ختمی و نماینده جدایه‌های *Pss* گندم بوده و گروه دو فقط شامل نماینده جدایه‌های *Pss* عامل نوارقرمز نیشکر است (شکل ٦).

بحث

در بررسی حاضر ٥٠ جدایه *Pss* از برگ‌های نیشکر آلوده به بیماری نوار قرمز نیشکر جدا و ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و الگوی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های مذکور تعیین شد. جدایه‌های عامل بیماری نوار قرمز نیشکر از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و الگوی پروتئین‌های سلولی بسیار مشابه بودند. از نظر میزان و سرعت تولید لوان و سیرینگومایسین در بین جدایه‌های مولد نوار قرمز نیشکر تفاوت وجود داشت.

جدایه‌های *Pss* بیماری‌زا در نیشکر از نظر خصوصیات فنوتیپی با جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت باکتریایی گندم تفاوت داشتند. برخلاف جدایه‌های مولد نوار قرمز نیشکر، جدایه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار و گندم قادر به استفاده از D- تارتارات نبودند. جدایه‌های مولد نوار قرمز نیشکر با سرعت کمتری تولید لوان نموده و تحدب کلنی‌های آنها در مقایسه با دیگرجدایه‌های *Pss* مورد مطالعه کمتر بود. وجود چنین تفاوت‌هایی قبلاً نیز گزارش شده است (Rahimian1995, 2000, 2004) و نمی‌تواند ارزش قابل توجهی در تمایز جدایه‌های مولد نوار قرمز نیشکر از سایر جدایه‌های*Pss* داشته باشد.

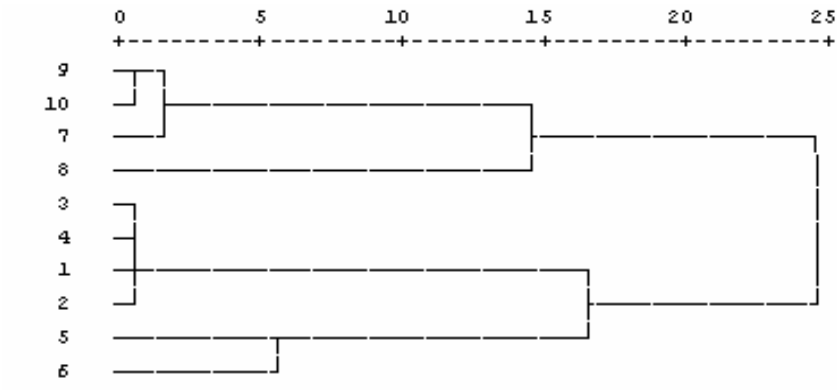
جدایه‌های *Pss* نیشکر علائم بیماری نوار قرمز را روی برگ‌های نیشکر مایه‌زنی شده ایجاد نمودند ضمنا جدایه‌های مذکور قادر به ایجاد بیماری روی گندم، ختمی و هلو نبودند. غیر بیماری‌زا بودن تعدادی از جدایه‌های گندم، ختمی و هلو بر روی نیشکر در مطالعات قبلی نیز (Rahimian 1995) مشخص شده بود.

جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر الگوی پروتئینی مشابهی داشته و در چندین باند پروتئینی با جدایه‌های *Pss* بیماری‌زا در درختان میوه هسته‌دار و گندم متفاوت بودند. تفاوت در نقوش پروتئینی جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر با جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت برگی گندم و جو نخستین بار توسط رحیمیان گزارش شد (Rahimian 1995) و پس از آن تفاوت میان الگوی پروتئینی جدایه‌های *Pss* نیشکر با جدایه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار، مرکبات و سلمه نیز گزارش شد (Taghavi & Ziaee 2003). هم‌چنین جدایه‌های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت برگی گندم و جو نیز الگوی پروتئینی مشابهی داشتند. شباهت الگوی پروتئینی جدایه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار، گندم و جو نیز در بررسی‌های *الداغی و همکاران* نیز گزارش شده است (Aldaghi *et al.* 2001).

در این بررسی مشخص گردید که الگوی اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش ERIC-PCR و BOX-PCR می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب و کارا، جهت تفکیک جدایه‌های *Pss* نیشکر از جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت برگی گندم مورد استفاده قرار گیرد.

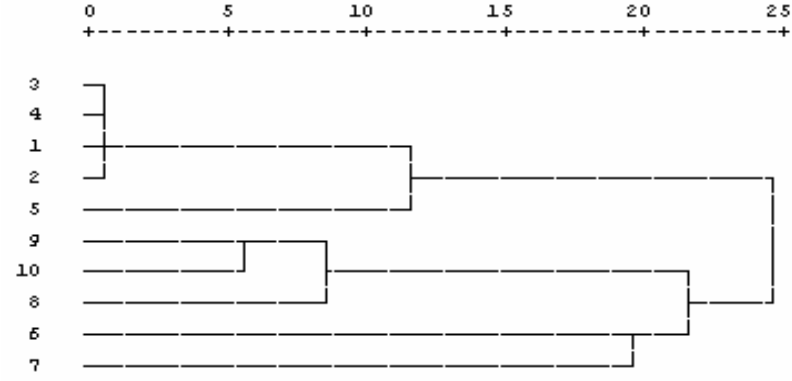
الگوی اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌های *Pss* مولد بیماری نوار قرمز نیشکر با هر سه آغازگر (ERIC1R، ERIC2 وBOX) در مقایسه با سایر جدایه‌های

www.SID.ir



شکل ۵. دندروگرام الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از BOX-PCR درجدایه‌های نماینده Pss بیماری‌زا در نیشکر(۲،۱، ۳و ٤)، درختان میوه هسته‌دار(۷، ۹ و ۱۰)، گندم (٦)، ختمی خواب‌آلود(۸)، جدایه اپی فیت Pss جدا شده از نیشکر (۵).

Fig. 5. Dendrogram of the BOX–PCR generated fingerprints patterns of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic on sugarcane (1, 2, 3 and 4), stone fruit trees (7, 9 and 10), wheat (6), sleepy mallow (8) and an epiphytic isolate of Pss from sugarcane (5).



شکل ٦. دندروگرام الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR و BOX-PCR و هر سه آغازگر (ERICIR، ERIC2 و BOXA1R) در جدایه‌های Pss بیماری‌زا در نیشکر(۱، ۲، ۳ و ٤)، جدایه اپی فیت نیشکر (۵)، ختمی خواب‌آلود (٦)، گندم (۷) و درختان میوه هسته‌دار(۸، ۹ و ۱۰).

Fig. 6. Dendrogram of the combined ERIC –PCR and BOX-PCR generated fingerprints patterns (ERIC 1R, ERICII and BOX primers) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic on sugarcane (1, 2, 3 and 4) , an epiphytic Pss from sugarcane (5), sleepy mallow (6), wheat (7) and stone fruit trees (8, 9 and 10).

مورد بررسی به‌عنوان الگوی متمایز و منحصر به‌فرد ارزیابی گردید. مقایسه الگوی اثرانگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های *Pss* بیماری‌زا در نیشکر، درختان میوه هسته‌دار، ختمی و گندم با هر سه آغازگر مشخص نمود که جدایه‌های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر همواره در گروهی جداگانه قرار گرفته واز نظر ژنتیکی کاملاً متمایز از سایر جدایه‌ها می‌باشند.

آنالیز آماری الگوی اثر ژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که جدایه‌های عامل بیماری نوار قرمز نیشکر با ۹٦ تا ۱۰۰ درصد شباهت در یک گروه قرار گرفته و در سطح تفاوت

www.SID.ir

۲۵ درصد از سایر جدایه‌ها متمایز می‌گردند. این یافته‌ها تایید کننده جایگاه تاکسونومیکی جداگانه و متمایز جدایه‌های *Pss* عامل بیماری نوار قرمز نیشکر در بین سایر جدایه‌های بررسی شده است.

به‌نظر می‌رسد که این نتایج تایید بر وجود اختصاصیت میزبانی درون پاتووار *Pss* است که توسط *لیتل و همکاران* (Little *et al*. 1998) پیشنهاد شده است. این محققین با بررسی الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR دریافتند که جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار بسیار به هم شبیه بوده و از نظر ژنتیکی از استرین‌های *Pss* جدا شده از محصولات زراعی و علف‌های هرز متمایز می‌گردند. در بررسی‌های دیگری نیز مشخص گردیده است که جدایه‌های*Pss* بیماری‌زا در حبوب هم از نظر ژنتیکی و هم از نظر فنوتیپی متمایز از سایر جدایه‌ها هستند (Legard *et al*. 1993, Saad & Hagedorn 1972). از طرف دیگر Cirvilleri و همکاران (Cirvilleri *et al*. 2005) دریافتند که بیماری‌زایی روی غلاف لوبیا منحصر به جدایه‌های جدا شده از حبوبات نبوده و طیف وسیعی از استرین‌های *Pss* جدا شده از مرکبات، سیب، درختان میوه هسته‌دار و گندم روی غلاف لوبیا قادر به ایجاد بیماری می‌باشند. هم‌چنین مشخص شد که تمام جدایه‌هایی که قادر به تولید سیرینگومایسین هستند قادر به ایجاد بیماری روی مرکبات و درختان میوه هسته‌دار می‌باشند درحالی‌که جدایه‌های فاقد توان تولید سیرینگومایسین قادر به ایجاد بیماری در درختان میوه نبودند. نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های با توان تولید سیرینگومایسین براساس الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل ازERIC-PCR در دو گروه قرار می‌گیرند. هم‌چنین مشخص گردید که استرین‌های جدا شده از غلات، مرکبات، حبوب و گندم اگر چه گروه مهمی از *Pss*های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند، ولی در سطح زیر گونه هتروژن بوده و در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای در ۷ گروه ژنتیکی قرار می‌گیرند (Cirvilleri *et al*. 2005).

الگوهای انگشت‌نگاری ژنتیکی مبتنی بر وجود توالی‌های تکراری ژنوم باکتری‌ها نمی‌توانند به‌عنوان معیاری قطعی و تعیین کننده در طبقه‌بندی به‌کار گرفته شود.

نتایج حاصل از بررسی اخیر با تأیید جایگاه جداگانه و متمایز جدایه‌های *Pss* عامل بیماری نوار قرمز نیشکر در بین جدایه‌های مورد بررسی می‌تواند نشانه‌ای از متمایز بودن جدایه‌های *Pss* نیشکر در سطح پاتوار محسوب گردد. البته لازم است تعداد بیشتری از جدایه‌های عامل بیماری نوار قرمز نیشکر مورد مطالعات کامل و دقیق ژنتیکی قرار گیرند تا بتوان با قاطعیت در مورد جایگاه تاکسونومیکی عامل بیماری نوار قرمز نیشکر اظهار نظر نمود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (2-1) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir