مقایسه برخی از ویژگی‌های فنوتیپی، سرولوژیکی و مولکولی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت غلات*

COMPARISON OF PHENOTYPIC, SEROLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *Pseudomonas syringae* PV. *syringae* STRAINS, THE CAUSAL AGENT OF BACTERIAL CANKER OF STONE FRUITS AND BLIGHT OF CEREALS

مجید الداغی[۱]**، حشمت‌اله رحیمیان[۲] و مجتبی محمدی[۳]

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۳)

چکیده

باکتری‌های موجود در گروه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* مجموعه ناهمگنی را تشکیل داده که دارای طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا با دامنه میزبانی متنوع می‌باشد. بیماری‌های شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت برگی گندم و جو از جمله بیماری‌هایی هستند که به‌وسیله جدایه‌های این باکتری ایجاد می‌گردند. جهت تشخیص جنبه‌های متمایز کننده جدایه‌های این پاتووار در روی این دو گروه میزبان (هسته‌داران و غلات)، ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها با انجام ۱۳۳ آزمون بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. واکنش تمامی جدایه‌های باکتری از هر دو گروه میزبانی، در آزمون‌های مختلف مشابه یکدیگر بوده و تنها در مصرف تری هالوز و آلفا دی ملیبیوز از یکدیگر قابل تمایز بودند. آنتی‌بیوگرام جدایه‌های عامل این دو بیماری اختلافات کمی را با یکدیگر نشان دادند. در مقابل نتایج آزمون بیماری‌زایی نشانگر اختصاصی بودن جدایه‌ها بر روی میزبان اصلی آنها بود. به علاوه جدایه‌هایی که در آزمون بیماری‌زایی علایم شدیدتری را روی میزبان‌ها به‌وجود آوردند، دارای قدرت تولید توکسین (سرینگومایسین) بیشتری بودند. آنتی‌سرم علیه نماینده جدایه‌های هر دو گروه میزبانی در خرگوش تولید و در مقایسه سرولوژیکی به‌کار برده شد. نتایج نشان داد که با کمک آزمون‌های سرولوژیکی می‌توان با درجه اطمینان بالایی جدایه‌های این دو گروه میزبانی را از یکدیگر متمایز ساخت. الکتروفورز پروتئین‌های محلول، شباهت زیاد الگوی پروتئینی جدایه‌های دو گروه میزبانی را نشان داد. البته معدودی از نوارهای پروتئینی در بین جدایه‌ها متفاوت بودند که خود نشان‌دهنده ناهمگونی حتی در درون جدایه‌های هر گروه می‌باشد. از نقوش آیزوزایمی برای تفکیک جدایه‌های این دو گروه نیز بهره گرفته شد. الگوی آنزیمی سوپراکسید دیسمیوتاز و در درجه بعدی نقوش استرازی قادر به تفکیک جدایه‌های دو گروه میزبانی از یکدیگر بودند. این نتایج نشان‌دهنده وجود ناهمگونی در جدایه‌های *P. syringage* pv. *syringae* و نیاز به انجام بررسی‌های وسیع و همه جانبه در جهت روشن ساختن طبقه‌بندی آنها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *P. syringage* pv. *syringae* ، شانکر درختان میوه هسته‌دار، بلایت باکتریایی غلات، ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی، سرولوژی، الگوی پروتئینی و آیزوزایمی

---

* : بخشی از طرح تحقیقاتی مستمر بیماری‌های مهم نباتات ، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:m_aldaghi@yahoo.com

۱. استادیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران

۲.استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی مازندران

۳.دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران ، کرج

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری‌های شانکر درختان میوه هسته‌دار و بلایت باکتریایی گندم و جو از جمله بیماری‌هایی هستند که به‌وسیله جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, 1902 ایجاد می‌شوند. این باکتری دارای جدایه‌های متنوعی است که بیماری‌های مختلفی را در گونه‌های متعلق به تعداد زیادی از خانواده‌های گیاهی ایجاد می‌کند. با وجود معرفی چند بیماری با منابع خارجی و ایرانی هنوز اطلاعات دقیقی در مورد ویژگی میزبانی (Host specificity) جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) وجود ندارد. هر چند Pss با سایر پاتووارهای *P. syringae* (Ps) از نظر ایجاد بیماری در طیف وسیعی از خانواده‌های گیاهی متفاوت است اما در زمینه این گستردگی دامنه میزبانی تردید زیادی وجود دارد (Young 1991).

در بسیاری موارد، جدایه‌هایی از Ps که قدرت آلوده سازی میزبان جدیدی به‌وسیله آنها مشخص شده و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی مشابه با جدایه‌های Pss هستند، در این پاتووار جای داده شده‌اند (Little *et al.* 1998). اما به عقیده *یانگ* (Young 1991) برخی جدایه‌های منتسب به این پاتووار شباهت کمی با Pss داشته و ممکن است به‌عنوان گونه‌جدید شناسایی و طبقه‌بندی شوند.

گررت و همکاران (Garrett *et al.* 1966) سودومونس‌های بیماری‌زای درختان هسته‌دار را با جدایه‌هایی از درختان گلابی مورد مقایسه قرار داده، چندین اختلاف منطقی و ثابت را بین جدایه‌های درختان هسته‌دار و گلابی پیدا نمودند. علیرغم مشاهده این تنوع، مطالعه دیگری نتوانست اختلاف فنوتیپی آشکاری بین جدایه‌های این باکتری از درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار را در جنوب آفریقا نشان دهد (Roos & Hattingh 1987a).

گاردان و همکاران (Gardan *et al.* 1990) تنوع فنوتیپی در ۵۰ جدایه Pss نماینده میزبان‌های مختلف گیاهی را بررسی نموده، متوجه تنوع بالا در این گروه و قرار گرفتن آنها در کلاسترهای جداگانه شدند.

به‌نظر می‌رسد جدایه‌های Pss از میزبان‌های مختلف، دارای نوعی ویژگی تخصیص میزبانی هستند. جدایه‌های Pss جدا شده از لوبیا باعث ایجاد واکنش بیماری‌زایی روی لوبیا می‌شوند در حالی‌که جدایه‌های این باکتری از سایر میزبان‌ها تولید واکنش‌های غیر بیماری‌زایی می‌نمایند (Little *et al.* 1998).

آزمون‌های سرولوژیکی نشت در آگار با نمونه‌های آنتی‌ژن از گونه‌های مختلف جنس *Pseudomonas*، وجود چندین آنتی‌ژن مشترک بین این گونه‌ها را نشان می‌دهد ولی هر یک از گونه‌ها حداقل یک آنتی‌ژن اختصاصی دارد. با استفاده از آزمون‌های انعقاد (Agglutination)، تنوع قابل ملاحظه‌ای در ترکیب آنتی‌ژنیک بین جدایه‌های Pss از درختان میوه هسته‌دار پیدا شده است. *اوتا و انگلیش* (Otta & English 1971) جدایه‌های این باکتری از بیش از ۳۰ میزبان مختلف را به ۱۰ سروتیپ مجزا بر اساس واکنش آنتی‌ژن‌های مقاوم به حرارت در آزمون‌های نشت در آگار تقسیم نمودند. *بیلینگ* (Billing 1970) با استفاده از آنتی‌ژن‌های مقاوم به حرارت توانست جدایه‌های Pss از دو میزبان یاس بنفش و گلابی را از هم مجزا سازد.

اختلاف نقوش پروتئینی در بررسی پنج پاتووار Pss، *P. s. mellea*، *P. s. savastanoi*، *P. s. tabaci* و *P. s. morsprunorum* حاصل آمده که با نتایج حاصل از آزمون‌های فنوتیپی هم‌بستگی داشته است (Buonaurio & Scortichini 1994). وجود اختلاف در نقوش پروتئینی بین جدایه ژاپنی و جدایه‌های مازندرانی Pss جدا شده از نیشکر نشان داده شده است. به‌علاوه

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌های این باکتری از درختان میوه الگوهای کاملاً متفاوتی نسبت به جدایه‌های نیشکر همین پاتووار ایجاد نمودند (Rahimian 1995).

استفاده از الگوهای آیزوزایمی برای تفکیک گونه‌ها و تاکسون‌های پایین‌تر معمول می‌باشد (Burkowicz & Rudolph 1994, Malandrin & Samson 1998). دو پاتوار Pss و *P. s.* tomato به‌وسیله مقایسه الگوهای ۲۶ آنزیم مختلف از هم تفکیک گردیدند (Denny 1988). *مالاندرین و سمسون* (Malandrin & Samson 1998) نشان دادند که الگوی استرازی جدایه‌های *P. s.* pisi اختصاصی این پاتووار بوده و بدین‌وسیله این پاتووار را از Pss متمایز ساختند.

با وجود تعداد قابل ملاحظه‌ای از مطالعات، هنوز کاملاً مشخص نیست که آیا همه میزبان‌های گزارش شده برای Pss به‌طور یکسان نسبت به همه جدایه‌ها حساس هستند، یا Pss فقط به‌عنوان یک مجموعه اصلی برای جدایه‌هایی با دامنه‌های میزبانی نسبتاً کم عمل می‌کند (Hirano & Upper 1990). هدف از مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای برخی از ویژگی‌های فنوتیپی، دامنه میزبانی، خصوصیات سرولوژیکی و مولکولی تعدادی از جدایه‌های Pss از دو گروه میزبانی متفاوت (هسته‌داران و غلات) می‌باشد. نتایج این بررسی به پیدا نمودن احتمالی جنبه‌های عمیق متمایز کننده این جدایه‌ها و طبقه‌بندی منطقی‌تر اعضای این پاتووار کمک خواهد نمود.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری

از برگ و سر شاخه درختان میوه هسته‌دار و برگ‌های گندم و جو مظنون به بیماری از استان‌های مازندران، تهران، اصفهان، فارس، کرمان و چهارمحال و بختیاری نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از ضد عفونی بافت‌ها به‌وسیله اتانول ۷۰٪، به‌کمک اسکالپل قطعات کوچکی از حاشیه شانکرها بریده و در یک تشتک حاوی مقدار کمی آب استریل قرار داده و هر ۱۵ دقیقه تشتک‌ها تکان داده شد. بعد از یک ساعت چند لوپ از آن روی محیط‌های King B (KB) و nutrient agar sucrose (NAS) مخطط گردید (Lelliott & Stead 1987).

برگ‌های دارای علایم بیماری از درختان میوه و گندم و جو ابتدا در زیر آب لوله کاملاً شسته شده، سپس در شرایط استریل قطعاتی از حد فاصل بافت آلوده و سالم در داخل یک هاون چینی محتوی چند قطره آب استریل له گردید و سوسپانسیون حاصله روی محیط‌های فوق مخطط گردید (Roos & Hattingh 1983). تشتک‌های کشت شده به‌مدت ۳-۲ روز در دمای ۲۷°C نگه‌داری شدند. کلونی‌های فلورسانت روی محیط KB و کلونی‌های تولید کننده لوان روی محیط NAS انتخاب و روی محیط آگار مغذی (nutrient agar, NA) نقطه‌گذاری شدند.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های هسته‌داران به دو روش صورت گرفت:

الف) در مایه‌زنی با روش *روس و هتینگ* (Roos & Hattingh 1987b) برگ‌های جوان سرشاخه‌های سبز بریده شده درختان هسته‌دار انتخاب و سطح برگ‌ها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی گردید. سپس یک قطره از سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی ۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر (جذب نوری ۰/۲-۰/۱ واحد در ۶۰۰ نانومتر) روی قسمت میانی برگ قرار داده، دو نیمه پهنک برگ بر روی هم در میان انگشتان دست به آرامی فشار داده شد تا زخم‌هایی ایجاد گردد. نمونه شاهد با آب مقطر

Archive of SID

www.SID.ir

استریل تیمار گردید. نتایج تا یک هفته ارزیابی گردید. آزمایش در گلخانه با دمای۳۰°C-۲۵ و در سه تکرار انجام شد.

ب) اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها روی بافت جوان سرشاخه‌ها با استفاده از روش *للیوت و استید* (Lelliott & Stead 1987) انجام گردید. از کشت ۳۶-۲۴ ساعته باکتری روی KB سوسپانسیونی به غلظت ۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر تهیه و به‌وسیله سرنگ بداخل سرشاخه‌های نرم گیاه تزریق گردید. محل‌های تزریق تا ۴۸ ساعت به‌وسیله پارافیلم محافظت شدند و علایم به‌وجود آمده تا یک ماه بعد از مایه‌زنی بازبینی گردید.

برای اثبات بیماری‌زایی روی گندم و جو، مطابق روش *اسمیت و هتینگ* (Smith & Hattingh 1991) عمل شد. ارقام گندم مهدوی، داراب ۲ و قدس، و جو والفجر، ریحان و استار در گلدان‌های حاوی خاک استریل در شرایط گلخانه کاشته شده و گیاهچه‌ها در مرحله سه تا پنج برگی مایه‌زنی گردیدند. برای این منظور سوسپانسیون باکتری (۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر) به‌وسیله سرنگ انسولین در زیر بشره بالایی برگ‌های گندم و جو تزریق گردید. گیاهان به‌مدت ۲۴ ساعت به وسیله کیسه‌های نایلونی پوشیده شدند. نتایج آزمون تا ده روز روی گیاهان بازبینی شد.

آزمون مایه‌زنی تقاطعی (دامنه میزبانی)

تعداد ۱۰ جدایه از هر گروه میزبانی به‌عنوان نماینده انتخاب شد و جدایه‌های هر گروه میزبانی، به میزبان‌های گروه دیگر (جدایه‌های هسته‌داران روی میزبان‌های گرامینه و بالعکس) مایه‌زنی و در شرایط یاد شده در بالا نگه‌داری و ارزیابی گردیدند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی و تغذیه‌ای جدایه‌ها

کلیه جدایه‌ها از هر دو گروه میزبانی به همراه دو جدایه استاندارد (اهدایی دکتر Psallidas از یونان) در آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین واکنش گرم، آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی، آزمون واکنش فوق حساسیت، تولید رنگدانه فلورسنت، اکسیداز، تولید لوان، آزمون کاتالاز، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، اوره آز، هیدرولیز ژلاتین، اثر روی شیر لیتموس، تحمل نمک طعام، تولید گاز از گلوکز و هیدرولیز اسکولین و سایر آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای با استفاده از روش‌های متداول در باکتری شناسی (Schaad 1988, Rahimian 1991) انجام گردید. نتایج استفاده از منابع کربنی تا ۲۸ روز ارزیابی گردید.

آزمون تولید سرینگومایسین

آزمون تولید سرینگومایسین (Syringomycin) به روش *یانگ* (Young 1991) صورت گرفت. یک دیسک کوچک از آگار حاوی قارچ *Endomyces geotrichum* Butler & Petersen (Anamorph: *Geotrichum candidum*) در مرکز یک تشتک پتری حاوی سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar, PDA) قرار داده شد و هشت جدایه از باکتری روی حلقه‌ای به شعاع یک سانتی‌متر از محل تلقیح قارچ کشت گردید. تشتک‌ها در دمای ۲۵°C نگه‌داری و ممانعت از رشد قارچ به‌وسیله جدایه‌های باکتری تا هشت روز ارزیابی گردید. آزمون در دو تکرار انجام شد.

آزمون حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

میزان حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده از روش *سالیداس* (Psallidas 1993) و با دیسک‌های تجارتی آنتی‌بیوتیک شرکت پادتن طب مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در دو تکرار انجام و پس از ۴۸ ساعت قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد.

آزمون‌های سرولوژیکی

الف) تهیه آنتی‌سرم: برای تولید آنتی‌سرم در خرگوش از روش *جونز و همکاران* (Jones *et al.* 1983) استفاده گردید. چهار جدایه باکتری (دو جدایه از میزبان‌های هسته‌دار و دو جدایه از میزبان‌های گندم و جو) انتخاب گردید. هر جدایه برای مدت ۲۴ ساعت روی محیط KB در ۲۵°C رشد داده شد. سلول‌های باکتریایی در محلول نمک طعام (saline, NaCl 0.85%) سوسپانسیون شدند. سوسپانسیون حاصل برای مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱°C اتوکلاو گردید. پس از انجام مراحل رسوب دهی و شستشو، غلظت هر آموده آنتی‌ژنی معادل ۲ واحد جذب نور در ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید. یک میلی‌لیتر از هر آموده به نسبت ۱:۱ با ادجونت ناقص فروند (Freund incomplete adjuvant) مخلوط و به صورت درون ماهیچه‌ای به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد. چهار تزریق بعدی به فواصل یک هفته‌ای صورت گرفت. یک هفته پس از تزریق نهایی و عیار سنجی آنتی‌سرم، از خرگوش‌ها خونگیری به‌عمل آمد و آنتی‌سرم‌ها استحصال گردید.

ب) آزمون‌های نشت دو سویه در آگار: این آزمون‌ها به روش اصلاح شده *شاد و همکاران* (Schaad *et al.* 1990) صورت گرفت. در تشتک‌های حاوی ژل‌های آگارز چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در مرکز تشتک و به فواصل ۵ میلی‌متر در اطراف ایجاد گردید. مقدار ۳۰-۲۵ میکرولیتر آنتی‌سرم در چاهک مرکزی و ۲۵-۲۰ میکرولیتر از آموده‌های آنتی‌ژنی مختلف در چاهک‌های کناری ریخته شد و به‌مدت یک روز در شرایط مرطوب در دمای آزمایشگاه نگه‌داری و سپس به یخچال منتقل گردید. این آزمایش به‌طور جداگانه برای هر چهار آنتی‌سرم با کلیه جدایه‌های جدا شده از میزبان‌های هسته‌دار و گندم و جو انجام شد. آنتی‌ژن‌های مصرفی در این آزمون به دو صورت تهیه گردیدند: سوسپانسیون اتوکلاو نشده سلول‌های کامل باکتریایی (با غلظت 1×10^{10} cfu) و دیگری سوسپانسیون اتوکلاو شده سلول‌های باکتریایی (با جذب نوری ۲ واحد) به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱°C (Jones *et al.* 1983, Mazarei *et al.* 1992, Mazarei & Ghasemi 1993).

تهیه الگوی پروتئینی

ژل پلی‌اکریل‌آمید (مرکب از ژل متمایز کننده ده درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد) براساس روش *لملی* (Laemmli 1970) تهیه گردید. الکتروفورز با استفاده از سیستم بافر ناپیوسته انجام شد (Rahimian 1991). پس از تهیه ژل، از کشتهای ۲۴ ساعته باکتری در روی محیط NA حاوی ۲-۱٪ گلوکز، سوسپانسیونی در آب مقطر تهیه و پس از یک‌بار شستشو و سانتریفیوژ، رسوب حاصل در آب مقطر سوسپانسیون شده و چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰nm به اندازه ۱/۵ واحد تنظیم گردید. نمونه‌ها در بافر حاوی سدیم دو دسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) و ۲-مرکاپتواتانول (2-mercaptoethanol) در حمام آبی جوشانده شد. به سرعت دمای نمونه‌ها به ۴°C رسانده و سپس سانتریفیوژ گردیدند. مقدار ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل ریخته شد و الکتروفورز با جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو (برم فنل بلو) به انتهای ژل انجام

Archive of SID

www.SID.ir

گردید. ژل در محلول یک در هزار کومازی بریلیانت بلو (G250) در متانول، آب و اسید استیک به ترتیب به نسبت ۱:۵:۵ روی شیکر به‌مدت ۸-۶ ساعت رنگ‌آمیزی شد. جهت رنگ‌بری، ژل در حلال فوق (بدون رنگ) تا زمان ظهور واضح نوارها در روی شیکر قرار داده شد.

تهیه الگوی آیزوزایمی

تهیه عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی جدایه ها، از روش *مالاندرین و سمسون* (Malandrin & Samson 1998) استفاده گردید. تعدادی از جدایه‌های باکتری (ده جدایه از هر گروه میزبانی) انتخاب شدند. هر جدایه روی دو تشتک پتری حاوی KB به‌طور کامل پخش گردید. بعد از ۲۴ ساعت تمام کشت حاصل از هر دو تشتک پتری در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس اسید کلریدریک pH ۷/۱) به‌همراه دو میلی‌مول در لیتر از Polyvinylpyrolidon (PVP، وزن مولکولی ۲۵۰۰۰) سوسپانسیون شد. سلول‌های باکتریایی به‌وسیله دستگاه اولتراسونیک در داخل حمام یخ خرد شدند. سوسپانسیون حاصل در ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه در ۴°C دو بار سانتریفیوژ و فاز رویی بازیافت گردید و تا هنگام مصرف در ۲۰°C- نگه‌داری شد.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید ناواسرشت: روش آماده سازی ژل مشابه طریقه تهیه ژل برای الکتروفورز پروتئین بود به‌جز این‌که ژل و بافر مخزن‌ها بدون SDS تهیه شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از هر عصاره آنزیمی پس از مخلوط شدن با ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه در چاهک‌های ژل ریخته شد. الکتروفورز تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل ادامه یافت. رنگ‌آمیزی به صورت‌های زیر انجام شد:

الف) رنگ‌آمیزی فعالیت استرازی: برای تهیه سوبسترای آنزیم استراز (EST) مطابق روش *سولتیس و سولتیس* (Soltis & Soltis 1989) مقدار ۲۵ میلی‌گرم α–Naphthyl acetate ، ۲۵ میلی‌گرم β-Naphthyl acetate و ۵۰ میلی‌گرم Fast blue RR salt به‌طور جداگانه در یک میلی‌لیتر استون حل شدند. مواد مذکور در ۵۰ میلی‌لیتر بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات سدیم (۶ pH) ریخته شد. ژل در داخل محلول مذکور قرار گرفته و در شرایط تاریکی تا ظهور کامل باندهای آیزوزایمی روی شیکر گذاشته شد.

ب) رنگ‌آمیزی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز: براساس روش *بوچامپ و فریدویچ* (Beauchamp & Fridovich 1971) ژل تهیه شده بعد از دو بار شستشو با آب مقطر، در ۵۰ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار $K\text{-}PO_4$ (pH ۷/۸) حاوی ۱۰ میلی‌گرم نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. پس از حذف محلول بالایی، مجددا ژل در ۵۰ میلی‌لیتر بافر ۳۰ میلی‌مولار $K\text{-}PO_4$ (pH ۷/۸) حاوی ۲۸ میکرومول ریبوفلاوین و ۲۸ میلی‌مول TEMED، در تاریکی قرار گرفت. پس از ۱۰ دقیقه محلول حاوی ژل در فاصله ۳۰ سانتی‌متری لامپ فلورسنت تا زمان ظهور واضح نوارهای بی‌رنگ در زمینه آبی‌رنگ ژل قرار داده شد.

نتیجه

از حدود ۲۰۰ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده، ۵۰ جدایه Pss براساس آزمون‌های بیوشیمیایی LOPAT و GATTA (Lelliott *et al.* 1966, Latorre & Jones 1979) و مقایسه با جدایه‌های استاندارد جداسازی گردید (جدول ۱). از این تعداد، ۳۵ جدایه از میزبان‌های هسته‌دار و ۱۵ جدایه از گندم و جو بودند. جدایه‌های Pss عامل شانکر درختان میوه در تمامی استان‌های نمونه‌برداری شده جداسازی گردید ولی باکتری عامل بلایت گندم و جو از نمونه‌های استان مازندران و تهران قابل جداسازی نبود. کلونی‌های

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. فهرست میزبانان و مکان جداسازی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) به‌کار برده شده در بررسی

Table 1. List of hosts and geographical origins of isolates of *Pseudomonas syringae* pv. syringae (Pss) used

کد جدایه (Isolate No.)	میزبان (Host)	مکان نمونه‌برداری (Location)	کد جدایه (Isolate No.)	میزبان (Host)	مکان نمونه‌برداری (Location)
1	زردآلو (Apricot)	شهریار (Shahriar)	26	هلو (Peach)	ساری (Sari)
2	گیلاس (Cherry)	بومهن (Bomehen)	27	آلو (Plum)	بومهن (Bomehen)
3	هلو (Peach)	ساری (Sari)	28	زردآلو (Apricot)	بومهن (Bomehen)
4	زردآلو (Apricot)	بومهن (Bomehen)	29	زردآلو (Apricot)	شیراز (Shiraz)
5	زردآلو (Apricot)	بایجان (Bayjan)	30	گیلاس (Cherry)	ساری (Sari)
6	جو (Barley)	اصفهان (Esfahan)	31	زردآلو (Apricot)	ساری (Sari)
7	گندم (Wheat)	مرودشت (Marvdasht)	32	گندم (Wheat)	شیراز (Shiraz)
8	گندم (Wheat)	سروستان (Sarvestan)	33	جو (Barley)	شیراز (Shiraz)
9	زردآلو (Apricot)	کرمان (Kerman)	34	گندم (Wheat)	چهارمحال (Charmahal)
10	زردآلو (Apricot)	باجگاه شیراز (Shiraz)	35	جو (Barley)	آباده (Abadeh)
11	گندم (Wheat)	بافت (Baft)	36	گندم (Wheat)	مهارلو (Maharloo)
12	هلو (Peach)	باجگاه شیراز (Shiraz)	37	گندم (Wheat)	کرمان (Kerman)
13	زردآلو (Apricot)	باجگاه شیراز (Shiraz)	38	زردآلو (Apricot)	سیدین کرمان (Kerman)
14	زردآلو (Apricot)	ساری (Sari)	39	زردآلو (Apricot)	شیراز (Shiraz)
15	گندم (Wheat)	سیدین کرمان (Kerman)	40	گیلاس (Cherry)	بومهن (Bomehen)
16	هلو (Peach)	باجگاه شیراز (Shiraz)	41	آلو (Plum)	بومهن (Bomehen)
17	آلو (Plum)	شهریار (Shahriar)	42	زردآلو (Apricot)	باجگاه شیراز (Shiraz)
18	گوجه (Plum)	ساری (Sari)	43	هلو (Peach)	باجگاه شیراز (Shiraz)
19	هلو (Peach)	ساری (Sari)	44	گندم (Wheat)	آباده (Abadeh)
20	گیلاس (Cherry)	شهریار (Shahriar)	45	گندم (Wheat)	مهارلو (Maharloo)
21	زردآلو (Apricot)	کرمان (Kerman)	46	جو (Barley)	اصفهان (Esfahan)
22	گیلاس (Cherry)	ساری (Sari)	47	گندم (Wheat)	سیدین کرمان (Kerman)
23	زردآلو (Apricot)	شهریار (Shahriar)	48	گیلاس (Cherry)	بایجان (Bayjan)
24	آلو (Plum)	شهریار (Shahriar)	49	زردآلو (Apricot)	سروستان (Sarvestan)
25	زردآلو (Apricot)	اصفهان (Esfahan)	50	زردآلو (Apricot)	شهریار (Shahriar)

Archive of SID

www.SID.ir

این باکتری در روی محیط NAS تقریباً سفید رنگ، مدور، برآمده (گنبدی) و لعاب‌دار با قطر ۴-۳ میلی‌متر بعد از چهار روز رشد در ۲۸°C-۲۵ بود.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گروه میزبانی اصلی

تمام جدایه‌های درختان میوه در آزمون بیماری‌زایی روی نهال‌های این گروه میزبانی بیماری‌زا بودند. در آزمون بیماری‌زایی روی برگ‌های درختان، علایم پس از ۴-۳ روز به‌صورت ایجاد لکه‌های آب‌سوخته و نقاط نکروزه در ناحیه رگبرگ میانی بود، در حالی‌که در برگ‌های شاهد چنین علایمی مشاهده نگردید. این جدایه‌ها روی سرشاخه‌های جوان، بعد از ۵-۴ روز ابتدا نواحی کلروزه در محل مایه‌زنی ایجاد کردند که به‌تدریج کاملاً نکروزه گردید و با تخریب بافت به‌صورت فرو رفته در آمدند (شکل ۱). در مواردی پوست این نواحی شکافته شده و ترشحات شیرابه مانند از آنها خارج گردید.

در نتیجه آزمون بیماری‌زایی روی گندم و جو نیز تمام جدایه‌های این گروه میزبانی، ۳-۲ روز بعد از مایه‌زنی باعث ایجاد علایم زردی وسیعی در اغلب ارقام شده که در نهایت علایم به صورت نکروز و خشکیدگی بافت ظاهر گردید (شکل ۲). باکتری مورد نظر دوباره از بافت‌های مبتلا به زردی جدا و شناسایی گردید. مایه‌زنی گیاهان شاهد با آب مقطر استریل نشانه‌ای در برگ و یا شاخه‌های مایه‌زنی شده ایجاد نکرد.

آزمون مایه‌زنی تقاطعی (دامنه میزبانی)

در مایه‌زنی جدایه‌های نماینده گروه هسته‌داران روی گندم و جو، تنها یک جدایه توانست روی گندم رقم قدس ایجاد بیماری نماید. دو جدایه نیز باعث رنگ پریدگی خفیف روی گندم رقم داراب ۲ و یک رقم جو (ریحان-استار) شدند.

هم‌چنین در مایه‌زنی جدایه‌های گروه میزبانی گندم و جو روی درختان میوه، فقط دو جدایه دارای توانایی ایجاد علایم تنها در نهال‌های هلو بودند، هر چند در مورد دو جدایه اخیر نیز شدت بیماری به اندازه جدایه‌های میزبان‌های هسته‌دار نبود.

خصوصیات فنوتیپی و تغذیه ای

خصوصیات فنوتیپی ۵۰ جدایه Pss (به همراه جدایه‌های استاندارد) در جدول ۲ خلاصه شده است. جدایه‌های مختلف (دو گروه میزبانی) در استفاده از منابع کربنی تری هالوز و آلفا دی ملیبیوز متفاوت عمل نمودند. اکثر قریب به اتفاق جدایه‌های درختان هسته‌دار از تری هالوز استفاده ننمودند در حالی‌که تقریباً همه جدایه‌های جدا شده از گندم و جو این ماده را مورد مصرف قرار دادند ولی فقط تعدادی از آنها رنگ محیط پایه را تغییر دادند. برعکس، آلفا دی ملیبیوز توسط همه جدایه‌های درختان میوه مصرف شد (همراه با تولید اسید و تغییر رنگ محیط)، ولی حدوداً نیمی از جدایه‌های گندم و جو در محیط حاوی این ماده تولید اسید کردند. در مورد ۱۳۱ آزمون باقی‌مانده تقریباً جدایه‌های دو گروه میزبانی یکسان عمل نمودند. میزان شباهت بین جدایه‌های دو گروه میزبانی با رابطه پیشنهادی *میثاقی و گروگان* (Misaghi & Grogan 1969) ($\%S= [N_s/(N_s+N_d)]\times100$) محاسبه گردید که در آن S% درصد شباهت، N_S نشانگر تعداد ویژگی‌های مشترک و N_d منکس کننده تعداد خصوصیات مثبت در یک گروه (کلاستر) ولی منفی در دیگری است. بر این اساس درصد شباهت جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار با جدایه‌های به‌دست آمده از گندم و جو ۹۸/۵٪ بود.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱. علایم حاصل از آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار روی سرشاخه‌ها

Fig. 1. Pathogenicity test of a stone fruit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolate on a twig.

شکل ۲. علایم حاصل از مایه‌زنی جدایه‌ای از غلات روی جو رقم ریحان.

Fig. 2. Pathogenicity test of a cereal *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolate on barley cv. Reihan.

Archive of SID

ارزیابی تولید سرینگومایسین

تولید سرینگومایسین در ۳۲ جدایه (۲۵ جدایه از هسته‌داران و هفت جدایه از گندم و جو) ردیابی گردید. ده جدایه (هفت جدایه از هسته‌داران و سه جدایه از گندم و جو) به‌طور ضعیف‌تری از رشد قارچ جلوگیری کردند و هشت جدایه باقی مانده، از این نظر منفی بودند. از نظر تولید سرینگومایسین، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌های دو گروه میزبانی مشاهده نشد.

آزمون آنتی‌بیوگرام

در بررسی حساسیت جدایه‌های مختلف در برابر ۲۸ آنتی‌بیوتیک براساس قطر هاله بازدارندگی جدایه‌ها به سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم تقسیم شدند.

www.SID.ir

جدول ۲. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از هسته‌داران و غلات

Table 2. Phenotypic characteristics of stone fruit and cereal *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates

خصوصیت (Characteristic)	واکنش (Reaction)	
	جدایه‌های هسته‌داران (Stone fruits isolates)	جدایه‌های گندم و جو (Cereal isolates)
واکنش گرم (Gram reaction)	−	−
رشد هوازی / بی هوازی (Oxidative / Fermentative)	هوازی / O	هوازی / O
اکسیداز (Oxidase)	−	−
واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive reaction)	+	+
لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی (Potato rot)	−	−
آرژنین دی هیدرولاز (Arginine dihydrolase)	−	−
تولید لوان (Levan formation)	+	+
تولید رنگدانه فلورسنت (Flourescent pigment)	+	+
هیدرولیز ژلاتین (Gelatin hydrolysis)	+	+
هیدرولیز اسکولین (Aesculin hydrolysis)	+	+
هیدرولیز نشاسته (Starch hydrolysis)	−	−
هیدرولیز توئین ۸۰ (Tween 80 hydrolysis)	+	+
هیدرولیز کازئین (Casein hydrolysis)	+	+
فعالیت تیروزیناز (Tyrosinase activity)	−	−
کاتالاز (Catalase)	+	+
احیاء نیترات (Nitrate reduction)	−	−
اثر روی شیر لیتموس: (Litmus milk:)		
قلیایی (Alkaline)	+	+
اسیدی (Acidic)	−	−
احیاء (Reduction)	+ −	+ −
تولید مواداحیاءکننده از سوکروز (Reducing compound from sucrose)	+	+
تحمل نمک طعام پنج درصد (5 % NaCl tolerance)	+	+
تحمل نمک طعام هفت درصد (7 % NaCl tolerance)	−	−
متیل رد (Methyl red)	−	−
استوئین (Voges proskauer)	−	−
تولید H_2S از پپتون (H_2S from peptone)	−	−

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. (ادامه) **Table 2. (continued)**

تولید ایندول (Indole formation)	−	−
لسیتیناز (Lecithinase)	−	−
تولید گاز از گلوکز (Gas from glucose)	−	−
اوره آز (Urease)	+	+
رشد در 4°C (Growth at 4°C)	−	−
رشد در 41°C (Growth at 41°C)	−	−
فعالیت هسته یخ (Ice nucleation)	+	+
تولید ۳- کتولاکتوز (3–Ketolactose formation)	−	−
تولید سرینگومایسین (Syringomycin production)	+	+
سدیم تارتارات (Sodium tartarate)	−	−
استفاده از منابع کربنی: (Utilization of carbon source :)		
دی گلوکز، دی گالاکتوز، دی مانوز، سوکرز (D–Glucose, D(+) Galactose, D–mannose, Sucrose)	+	+
لاکتوز، ادونیتول، مالتوز (Lactose, Adonitol, Maltose)	−	−
دی ملزیتوز، رافینوز، ال رامنوز (D(+) Melezitose, Raffinose, L–Rhamnose)	−	−
دی سوربیتول، ال آرابینوز، دی زایلوز (D–Sorbitol, L–Arabinose, D–Xylose)	+	+
ال زایلوز، دولسیتول، دی سلوبیوز (L–Xylose, Dulcitol, D(+) Cellobiose)	−	−
دی آرابینوز، دی فوکوز، ال سوربوز (D–Arabinose, D–Fucose, L–Sorbose)	−	−
دی فروکتوز، ال آرابیتول، دی مانیتول، ریبوز (D(-) Fructose, L(-) Arabitol, D–Mannitol, Ribose)	+	+
پالاتینوز، دی تیو اریتریتول (Palatinose, D–Thioerythritol)	−	−
مزو اریتریتول، مزواینوزیتول، مایواینوزیتول (Mesoerythritol, Meso–Inositol, Myo–Inositol)	+	+
سالیسین، دکسترین، گلیکوژن، گلایسین، اینولین (Salicin, Dextrin, Glycogen, Glycine, Inulin)	−	−
ال آلانین، ال آسپاراژین، ال هیستیدین (L–Alanine, L–Asparagine, L–Histidin)	+	+
ال متیونین، بتا آلانین، ال تیروزین (L–Methionine, β-Alanine, L–Tyrosine)	−	−
ال پرولین، ال آسپارتیک اسید، ال لوسین (L–Proline, L–Aspartic acid, L–Leucine)	+	+
ال ایزولوسین، دی ال لیزین، دی ال والین (L–Isoleucine, DL–Lysine, DL–Valine)	−	−
ال آرژنین، ال آسکوربیک اسید (L–Arginine, L–Ascorbic acid)	+	+
ال فنیل آلانین، ال سیستین، ال اورنیتین (L–Phenylalanine, L(-) Cystine, L–Ornithine)	−	−
دی ال اورنیتین، هوموسرین، تریپتوفان (DL–Ornithine, Homoserine, Tryptophane)	−	−
مالات، موکات، سیترات، فومارات (Malate, Mucate, Citrate, Fumarate)	+	+

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. (ادامه) **Table 2. (continued)**

استات، فورمات، بنزوات، تاروکولات (Acetate, Formate, Banzoate, Taurocolate)	−	−
لاکتات، سوکسینات، مالونات، گلوتامات (Lactate, Succinate, Malonate, Glutamate)	+	+
پروپیونات، هیپورات، والرات، بوتیرات (Propionate, Hippurate, Valerate, Butyrate)	−	−
اگزالات، ال تارتارات، دی تارتارات (Oxalate, L–Tartarate, D–Tartarate)	−	−
گالاکترونات، سدیم گلوکونات (Galacturonate, Sodium gluconate)	+	+
کوئینات، لوولینات، آنترانیلات (Quinate, Levulinate, Antranilate)	−	−
گلیسرول (Glycerol)	+	+
نشاسته (Starch)	−	−
پروپانول، اتانول (Propanol, Ethanol)	−	−
بیوتین، تیامین، نیاسین (Biotin, Thiamin, Niacin)	−	−
بتائین (Betain)	+	+
گوانین، ادنین (Guanine, Adenine)	−	−
نیکوتین آمید، ژرانیول، ژلاتین (Nicotinamide, Geraniol, Gelatin)	−	−
تری هالوز (Trehalose)	−	+
آلفا دی ملیبیوز (α-D-Melibiose)	+	+

جدایه‌های هر دو گروه میزبانی به آنتی بیوتیک‌های داکسی سایکلین، استرپتومایسین، توبرامایسین، تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، نالیدیکسیک اسید و کلرامفنیکل حساس و یا بسیار حساس بودند. هم‌چنین تمامی جدایه‌ها نسبت به نئومایسین، اریترومایسین، آمیکاسین، کانامایسین، جنتامایسین و ریفامپیسین نیمه حساس و نسبت به آنتی بیوتیک‌های کولیستین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، فورازولیدون، نیتروفورانتوئین، سفازولین، نووبیوسین، لینکومایسین، اگزاسیلین، پنی سیلین، سفالکسین، کلوگزاسیلین، ونکومایسین و سفتی زوکسیم مقاوم بودند. از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌های دو گروه میزبانی مشاهده نشد.

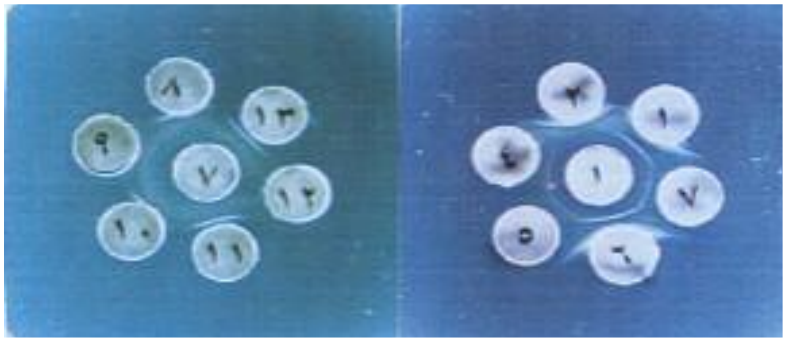
آزمون‌های سرولوژیکی

الف) آزمون انعقاد میکروسکوپی: از این آزمون تنها برای تعیین عیار آنتی‌سرم‌ها استفاده گردید. عیار آنتی‌سرم‌های تهیه شده علیه جدایه‌های ۱، ۲۵ (جدایه‌های هسته‌داران)، ۷ و ۳۴ (جدایه‌های گندم و جو) به ترتیب $\frac{۱}{۵۱۲}, \frac{۱}{۱۰۲٤}, \frac{۱}{۱۰۲٤}, \frac{۱}{۱۰۲٤}$ تعیین گردید.

ب) آزمون‌های نشت دو سویه در آگار: بر اساس یافته‌های این آزمون‌ها (شکل‌های ۳و۴) کلیه جدایه‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند (جدول ۳). گروه I دربرگیرنده جدایه‌هایی می‌باشد که در برابر هر چهار آنتی‌سرم واکنش مثبت نشان دادند (۲۰ جدایه). گروه Π جدایه‌هایی را شامل می‌شود که فقط با آنتی‌سرم‌های تهیه شده علیه دو جدایه هسته‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

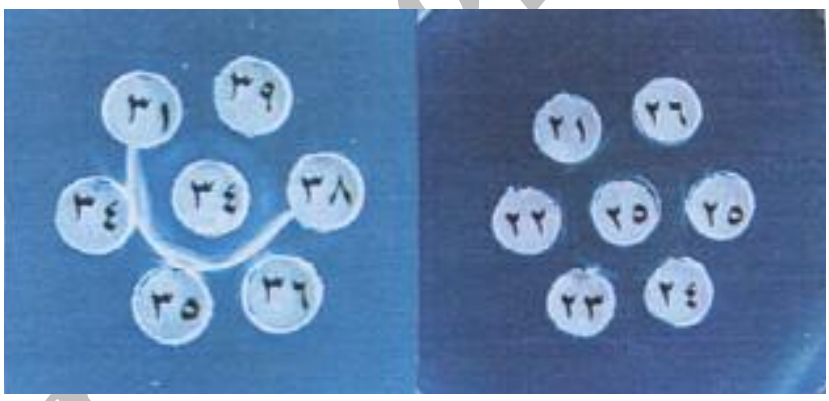


A B

شکل ۳. آزمون نشت دوسویه در آگار به‌وسیله آنتی‌ژن‌های تیمار نشده با حرارت (چاهک‌های کناری) در مقابل آنتی‌سرم‌های استحصالی (چاهک‌های میانی). **A** : واکنش رسوب در مقابل آنتی‌سرم تهیه شده علیه یکی از جدایه‌های غلات، **B** : واکنش رسوب در مقابل آنتی‌سرم تهیه شده علیه یکی از جدایه‌های هسته‌داران. شماره‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۳ مربوط به جدایه‌های هسته‌داران و بقیه مربوط به جدایه‌های غلات هستند.

Fig. 3. Ouchterlony double diffusion test by untreated antigens (peripheral wells) against prepared antisera (central well). A: Precipitation reaction with antiserum prepared against a cereal *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolate, B: Precipitation reaction with antiserum prepared against a stone fruit isolate. No. 1, 2, 4, 5, 9, 10, 12 and 13 are of stone fruit strains, and the rest belong to cereal strains.

.



A B´

شکل ۴. آزمون نشت دوسویه در آگار به‌وسیله آنتی‌ژن‌های تیمار شده با حرارت (چاهک‌های کناری) در مقابل آنتی‌سرم‌های استحصالی (چاهک میانی). **A** : واکنش رسوب در مقابل آنتی‌سرم تهیه شده علیه یکی از جدایه‌های غلات، **B** : واکنش رسوب در مقابل آنتی‌سرم تهیه شده علیه یکی از جدایه‌های هسته‌داران. شماره‌های ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۳۱، ۳۸ و ۳۹ مربوط به جدایه‌های هسته‌داران و بقیه مربوط به جدایه‌های غلات هستند.

Fig. 4. Ouchterlony double diffusion test by treated (autoclaved) antigens (peripheral wells) against prepared antisera (central well). A: Precipitation reaction with antiserum prepared against a cereal *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolate, B: Precipitation reaction with antiserum prepared against a stone fruit isolate. No. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 38 and 39 are of stone fruit strains, and the rest belong to cereal strains.

www.SID.ir

جدول ۳. گروه‌بندی سرولوژیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از هسته‌داران و غلات با درنظر گرفتن نتایج حاصل از هر دو تیمار آنتی‌ژنی (سوسپانسیون سلول‌های کامل باکتریایی و سوسپانسیون اتوکلاو شده سلول‌های باکتریایی). برای خصوصیات جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

Table 3. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from stone fruits and cereals: both antigen treatments (untreated and autoclaved bacterial cells) for isolates characteristics (host) refer to table 1.

گروه‌ها (Groups)	واکنش‌های سرولوژیکی* (Serological reaction*)	کد جدایه‌ها (Isolate No.)	تعداد جدایه‌ها (Number of isolates)
I	ABCD	5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,17,18,26,27,41,42,43,48,49,50	20
II	ABcd	1,2,3,12,16,19,20,21,22,23,24,25,28,29,30,31,38,39,40	19
III	aBCD	32,33,34,35,44,45	6
IV	abCD	36,37,46,47	4

*: حروف بزرگ و کوچک به‌ترتیب نشان‌دهنده واکنش سرولوژیکی مثبت و منفی هستند.

A (a): آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه یک، B (b): آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه ۲۵

C (c): آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه هفت، D (d): آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه ۳۴

(AوB آنتی‌سرم‌های جدایه‌های هسته‌داران و CوD آنتی‌سرم‌های جدایه‌های غلات هستند).

* : Capital and small letters show serological positive and negative reactions, respectively.
A(a): antiserum prepared against stone fruit isolate No.1
B(b): antiserum prepared against stone fruit isolate No.25
C(c): antiserum prepared against cereal isolate No.7
D(d): antiserum prepared against cereal isolate No.34

جدول ۴. گروه‌بندی سرولوژیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از هسته‌داران و غلات تنها با درنظر گرفتن نتایج حاصل از تیمار حرارتی آنتی‌ژن‌ها. برای خصوصیات جدایه‌ها (میزبان) به جدول ۱ مراجعه شود.

Table 4. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from stone fruits and cereals: treated (autoclaved) antigens. for isolates characteristics (host) refer to table 1.

گروه‌ها (Groups)	واکنش‌های سرولوژیکی (Serological reaction)	کد جدایه‌ها (Isolate No.)	تعداد جدایه‌ها (Number of isolates)
I’	ABCD	4,5,6,7,8,9,10,11,14,15	10
II’	ABcd	1,2,3,12,16,17,39,41,42,43,48,49,50	13
III’	aBcd	19,20,21,22,23,24,25,28,29,30,31,38,40	13
IV’	aBCd	13,18,26,27	4
V’	abCD	32,33,34,35,36,37,44,45,46,47	10

توضیحات این جدول مشابه جدول سه است .

Legend of this table is the same with table 3.

واکنش رسوب نشان دادند (۱۹ جدایه). جدایه‌های گروه III با دو آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه‌های غلات و یکی از آنتی‌سرم‌های هسته‌داران (آنتی‌سرم شماره ۲۵) پاسخ مثبت دادند (شش جدایه). گروه IV شامل جدایه‌هایی بود که تنها با دو آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه‌های غلات واکنش مثبت نشان دادند (چهار جدایه). یک جدایه در

Archive of SID
www.SID.ir

هیچ یک از این گروه‌ها قرار نگرفت. این گروه‌بندی در صورتی صحیح خواهد بود که نتایج حاصل از هر دو تیمار آنتی‌ژنی (سلول‌های کامل باکتریایی و سلول‌های اتوکلاو شده باکتریایی) به‌طور توأم در نظر گرفته شود؛ یعنی اگر آنتی‌سرمی با یکی یا هر دو تیمار یک جدایه (آنتی‌ژن) واکنش مثبت نشان دهد در مجموع واکنش این آنتی‌سرم با آن جدایه مثبت ارزیابی می‌شود.

در صورتی‌که فقط نتایج حاصل از واکنش آنتی‌سرم‌ها با سلول‌های اتوکلاو شده باکتریایی در نظر گرفته شود جدایه‌ها به پنج گروه سرولوژیکی تقسیم می‌شوند که نتایج آن در جدول ۴ خلاصه شده است. در این جدول مشخص می‌شود که تنها پنج جدایه از گروه درختان میوه هسته‌دار (حاضر در گروه 'I) با هر دو آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایه‌های غلات واکنش مثبت نشان می‌دهند و بقیه جدایه‌های گروه هسته‌داران با یکی و یا هیچ کدام از آنتی‌سرم‌های غلات واکنش رسوبی نمی دهند. به‌علاوه ۷۲٪ از کل جدایه‌ها (۳۶ جدایه) تنها با آنتی‌سرم‌های تهیه شده علیه جدایه‌های همان گروه واکنش مثبت نشان دادند و نه با آنتی‌سرم‌های گروه میزبانی مقابل (گروه‌های 'II، 'III و 'V)، در صورتی‌که در نتایج توامان تیمار حرارتی و غیر حرارتی آنتی‌ژن‌ها تنها ۴۶٪ از جدایه‌ها (۲۳ جدایه) دارای این خصوصیت بودند (گروه‌های II و IV در جدول ۳)، که خود دال بر افزایش اختصاصیت در تیمار حرارتی آنتی‌ژن‌ها می‌باشد.

الگوی پروتئینی جدایه‌ها

الکتروفورز پروتئین سلولی کلیه جدایه‌ها به روش SDS-PAGE، سطح بالایی از تشابه بین جدایه‌های Pss از مناطق مختلف ایران را آشکار ساخت (شکل ۵). صرف نظر از اختلافات جزئی، الگوهای پروتئینی جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار نسبت به جدایه‌های مولد بلایت غلات تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نداده و در نتیجه تمایز آنها به دو گروه مجزا بر این پایه امکان‌پذیر نبود.

الگوی آیزوزایمی جدایه ها

الف) الگوهای آیزوزایمی استرازی (EST): جدایه‌های مختلف آزمون شده، الگوهای استرازی متنوعی را ایجاد نمودند (شکل ۶ و زیموگرام ۱). در مجموع ۱۳ ایزومورف استرازی مختلف ثبت گردید که از a تا m نام‌گذاری شدند و هر جدایه دارای تعدادی ایزومورف بود. هر ایزومورف، یک نوار آیزوزایمی با طرح و یا وزن مولکولی متفاوت با سایر نوارهای آیزوزایمی می‌باشد. برای جدایه‌های انتخابی Pss از هر دو گروه میزبانی، در مجموع نه نوع زیموتایپ استرازی متفاوت حاصل آمد (جدول ۵). هر زیموتایپ، یک الگوی متفاوت آنزیمی دارای یک یا چند ایزومورف می‌باشد. به‌جز یک جدایه از هر گروه میزبانی که الگوی استرازی یکسانی را نشان دادند (زیموتایپ ۴) بقیه جدایه‌های این دو گروه میزبانی، الگوهایی را ایجاد نمودند که با یکدیگر همپوشانی نداشتند. بنابراین تهیه پروفیل استرازی می‌تواند به‌عنوان یک آزمون اختصاصی با درجه اطمینان بالا جدایه‌های این دو گروه میزبانی را از هم متمایز سازد.

ب) الگوهای آیزوزایمی سوپر اکسید دیسمیوتاز (SOD): از میان ۲۰ جدایه Pss بررسی شده، هشت نوار (ایزومورف) مختلف آیزوزایمی آشکار گردید که از a تا h نام‌گذاری شدند (شکل ۷ و زیموگرام ۲). جدایه‌های آزمون شده از دو گروه میزبانی، در هفت زیموتایپ مجزا جای گرفتند جدول ۶). همانند الگوی استرازی، بین الگوی SOD جدایه‌های بررسی شده تنوع قابل ملاحظه‌ای

Archive of SID

www.SID.ir