شناسایی جدایه‌های *Brenneria nigrifluens* *

IDENTIFICATION OF *Brenneria nigrifluens* ISOLATES

نرگس فلاحی چرخابی[۱]، مسعود شمس‌بخش[۱]**، حشمت اله رحیمیان[۲] و پژمان خدایگان[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۷/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۲۶)

چکیده

زخم پوستی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) با عامل *Brenneria nigrifluens* سبب ایجاد شانکر در پوست تنه و شاخه‌های قطور (مسن) می‌شود. تشخیص دقیق و سریع بیماری، عامل مهمی در کنترل و کاهش خسارت بیماری است. در بررسی حاضر ۵۹ جدایه باکتری از ۱۱۴ نمونه دارای علائم زخم جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران، گلستان، کرمان و کرمانشاه جداسازی شد. به علاوه ۱۰ جدایه از استان فارس، یک جدایه از استان کهگیلویه و بویراحمد و یک جدایه از استان کردستان برای مقایسه با جدایه‌های جمع‌آوری شده به کار برده شد. جدایه‌ها براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به دو گروه *B. nigrifluens* و گونه‌های نزدیک به آن تقسیم شدند. بررسی الگوی پروتئینی جدایه‌ها نیز این تقسیم بندی را تأیید نمود. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه دی‌ان‌ا (DNA) مورد انتظار به طول حدود ۲۵۵ جفت باز در ۲۴ جدایه *B. nigrifluens* تکثیر شد که PCR^+ نامیده شدند. پس از گذشت هشت هفته از زمان مایه‌زنی نهال‌های گردو با جدایه‌های PCR^+ لکه‌های آبسوخته و زخم پیش رونده‌ای روی سرشاخه‌ها ایجاد شد، در حالی که مایه‌زنی با جدایه‌های PCR^- نتوانست علائم بیماری را روی سرشاخه‌های مایه‌زنی شده ایجاد کند. به منظور تعیین دقیق گونه جدایه‌ها و بررسی کارایی و فراگیری آغازگرهای اختصاصی استفاده شده، ناحیه 16S rDNA یک جدایه PCR^+ و سه جدایه PCR^- تکثیر و تعیین ترادف شد، نتایج نشان داد که تنها ترادف 16S rDNA جدایه PCR^+ شباهت بالایی با گونه *B. nigrifluens* داشت. بر پایه نتایج تحقیق حاضر آزمون‌های متداول فنوتیپی به همراه انجام آزمون بیماری‌زایی و یا آزمون‌های تکمیلی مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص قطعی *B. nigrifluens* ضروری است.

واژه‌های کلیدی: زخم پوستی گردو، آغازگر اختصاصی، 16S rDNA

Archive of SID

---

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

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان

www.SID.ir

مقدمه

بیماری زخم (شانکر) پوستی یا سطحی گردو ناشی از *Brenneria nigrifluens* (*Erwinia nigrifluens*) (Wilson) Hauben *et al.* 1998 یکی از شایع‌ترین بیماری‌های گردو محسوب می‌شود. عامل بیماری برای اولین بار توسط *ویلسون و همکاران* (Wilson *et al.* 1957). گونه‌ای از جنس *Erwinia* به نام *Erwinia nigrifluens* شناسایی و نام‌گذاری گردید. سپس باکتری عامل توسط *هابن و همکاران* (Hauben *et al.* 1998) به *B. nigrifluens* تغییر نام یافت این بیماری در باغ‌های تولید الوار و میوه با تضعیف درختان گردو سبب ایجاد خسارت می‌شود. علائم در مراحل اولیه بیماری از خارج قابل مشاهده نبوده و پوست حالت متورم و برآمده پیدا می‌کند. در ابتدا نواحی بافت مرده به صورت لکه‌های گرد کوچکی ظاهر شده که بعداً توسعه یافته و زخم‌های گسترده بدون شکل مشخصی را تشکیل می‌دهند. علائم بیماری در اکثر موارد محدود به ناحیه پوست است (Scortichini 1999; Saccardi *et al.* 1998; Loreti *et al.* 2004; Mazzaglia *et al.* 2006). بیماری پس از ایالت کالیفرنیا (Wilson *et al.* 1957) از ایران (Rahimian 1989)، اسپانیا (Lopez *et al.* 1994)، ایتالیا (Morone *et al.* 1998; Saccardi *et al.* 1998; Scortichini 1999; Carella *et al.* 2003) و فرانسه (Menard *et al.* 2004) گزارش شده است. در ایران اولین بار از ساری و نکا (Rahimian 1989) و پس از آن از سایر مناطق مازندران (Harighi & Rahimian 1997)، فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Yousefi Kopaei *et al.* 2007)، کرمان (Baradaran & Ghasemi 2004)، کردستان (Harighi 2006) و گیلان و گلستان (Jamalzade *et al.* 2009) گزارش شد.

شناسایی *B. nigrifluens* بر پایه جداسازی مستقیم از بافت آلوده، آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و آزمون بیماری‌زایی استوار است. از آن جایی که تعداد زیادی از گونه‌های باکتریایی از زخم‌های گردو جدا می‌شوند (Moretti *et al.* 2007)، به علاوه از آزمون‌های بیوشیمیایی به تنهایی نمی‌توان به عنوان یک آزمون افتراقی استفاده نمود (Moretti *et al.* 2007) و به علت اهمیت ردیابی سریع بیمارگر برای رعایت بهداشت زراعی و پایش شیوع بیماری، استفاده از روش‌های سریع و مطمئن در راستای افزایش صحت و دقت تشخیص بیمارگر حائز اهمیت است (Loreti *et al.* 2008).

در مطالعه حاضر ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌های جدا شده از زخم پوستی درختان گردو از مناطق مختلف کشور تعیین و جدایه‌ها در دو گروه عمده قرار گرفتند. بررسی الگوی پروتئینی این جدایه‌ها نیز همین نتیجه را تأیید کرد. به منظور تشخیص دقیق گونه *B. nigrifluens* آزمون بیماری‌زایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (Loreti *et al.* 2008) انجام شد. به منظور بررسی کارآمدی ویژگی‌های فنوتیپی، الگوی پروتئینی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آزمون بیماری‌زایی در شناسایی گونه‌ی *B. nigrifluens*، توالی 16S rDNA تعدادی از جدایه‌ها به عنوان نماینده تکثیر و تعیین ترادف شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری

در ماه‌های اردیبهشت و خرداد سال ۱۳۸۷ حدود ۱۱۴ نمونه‌ی گیاهی مشکوک و دارای علائم زخم از تنه و شاخه‌های درختان گردو از استان‌های گلستان شامل مناطق گرگان، دلند، مینودشت، بندرگز و کردکوی، مازندران

Archive of SID

www.SID.ir

شامل مناطق ساری، بادله، نکا و رستم کلا، کرمان (بافت) و کرمانشاه (صحنه) جمع‌آوری و به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. یازده جدایه جمع‌آوری شده از استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Yousefi Kopaei *et al.* 2007) و یک جدایه از استان کردستان (Harighi 2006) نیز برای مقایسه با جدایه‌های جمع‌آوری شده از سایر مناطق کشور دریافت شد.

جداسازی عامل بیماری

نمونه‌ها ابتدا با آب معمولی و سپس با آب مقطر شسته شدند. برای جداسازی باکتری قطعاتی از بافت حد فاصل ناحیه سالم و بیمار در داخل یک تشتک سترون حاوی آب مقطر سترون خرد شده و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در شرایط آزمایشگاه یک لوپ از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB-Agar)، حاوی ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول و پنج گرم عصاره مخمر مخطط گردید. پس از دو تا سه روز نگهداری در دمای ۲۸ °C تک‌پرگنه‌های سبز متالیک جدا شد. این جدایه‌ها به منظور استفاده در بررسی‌های بعدی روی محیط آگار غذایی حاوی ساکاروز (NAS) (۲۰ گرم آگار غذایی و پنج گرم ساکاروز در لیتر) کشت داده شدند.

خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

برای خالص‌سازی، هر جدایه دوباره روی محیط آگار غذایی مخطط شد و پرگنه‌های منفرد انتخاب و دوباره روی همین محیط مخطط شدند. به منظور نگهداری جدایه‌ها، سوسپانسیون کدری از آنها در آب مقطر سترون تهیه و در دمای ۴ °C نگهداری شد (Lelliot & Stead 1987). هم‌چنین سوسپانسیون کدری از باکتری در ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون تهیه و به آن ۴۰۰ میکرولیتر گلیسرول اضافه شده و پس از مخلوط کردن در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تمامی جدایه‌ها بررسی گردید. آزمون گرم با حلالیت در پتاس (KOH) سه درصد به روش *ساسلو و همکاران* (Suslow *et al.* 1982) و آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش *هیو و لایف سن* (Hugh & Leifson 1953) صورت گرفت. آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره‌ای از باکتری روی کاغذ صافی آغشته به محلول یک درصد تترامتیل پارافنیل دی‌آمین دی-هیدروکلراید صورت گرفت (Kovacs 1956). آزمون لهیدگی سیب زمینی به روش *شاد و همکاران* (Schaad *et al.* 2001) و آزمون فوق حساسیت (HR) در توتون و شمعدانی به روش *کلمنت و همکاران* (Klement *et al.* 1964) انجام شد. تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B و رنگدانه صورتی روی محیط YDC بررسی شد. آزمون‌های آرژنین دی‌هیدرولاز به روش *تورنلی* (Thornely 1960) و هیدرولیز نشاسته به روش *کوان* (Cowan 1974) انجام شد. آزمون‌های اوره‌آز، تولید H_2S از سیستئین، تولید اندول، تولید لوان، رشد روی محیط کشت حاوی چهار درصد نمک طعام (NaCl) و هیدرولیز اسکولین انجام گرفت. در آزمون توانایی استفاده از اسیدهای آلی و تولید اسید از قندها از محیط پایه آیر (Ayer) و غلظت ۰/۲ تا ۰/۳ درصد قند یا اسید آلی مورد نظر استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

شد (Schaad *et al.* 2001).

مقایسه الگوی پروتئین سلولی

جدایه‌های باکتری روی محیط آگار غذایی کشت داده شدند و پس از ۲٤ ساعت، سوسپانسیونی از آنها در آب مقطر تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ٦۰۰ نانومتر برابر با یک تنظیم شد. سلول‌ها با اضافه کردن یک دهم حجم نمونه، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد و پنج دقیقه نگهداری در حمام آب جوش پاره شده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از رونشین حاصل به عنوان پروتئین‌های سلولی برای الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز در سیستم ناپیوسته *لملی* (Laemmli 1970) با ژل متراکم کننده پنج درصد و ژل متمایز کننده ۱۰ درصد و در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی‌آمپر انجام شد و با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل پایان پذیرفت. ژل در محلول رنگ‌آمیزی حاوی ۰/۱۲ درصد کوماسی بریلیانت بلو، ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک به مدت یک شب روی شیکر قرار داده شد. ژل در محلول ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک رنگ‌بری و از آن عکس گرفته شد.

آزمون بیماری‌زایی

بذرهای گردوی ایرانی در محلول پنج درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و دو بار با آب مقطر سترون شسته شدند. بذرها در آب و در دمای اتاق به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شده و با خروج ریشه اولیه در گلدان‌های سه لیتری خاک سبک سترون کاشته شدند. مایه‌زنی روی نهال‌های پنج تا شش ماهه انجام شد. سوسپانسیونی از کشت ۴۸ ساعته باکتری‌های روی محیط آگار غذایی در آب مقطر سترون تهیه شد و کدری آنها به ۰/۰۱ واحد در ۶۰۰ نانومتر (معادل $۱۰^{۶} \times ۵ - ۱$ سلول زنده در میلی‌لیتر) تنظیم شد. با استفاده از سرنگ سترون ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در سرشاخه‌های جوان تزریق گردید. علاوه بر آن مقداری از پرگنه باکتری نیز به وسیله خلال دندان برداشته و در بافت همان سرشاخه به صورت مستقیم مایه‌زنی گردید. محل زخم‌های حاصل از خلال دندان به وسیله نوار پارافیلم پوشانده شد (Loreti *et al.* 2004). به منظور حفظ رطوبت اولیه، گلدان‌ها به مدت ۷۲ ساعت در کیسه نایلونی قرار داده شده و پس از برداشتن کیسه در شرایط گلخانه (۲۹° C– ۲۰) نگهداری شدند. چهار جدایه باکتری برای مایه‌زنی به کار رفت و هر جدایه دست‌کم به دو نهال مایه زنی شد. در نهال‌های شاهد از آب مقطر سترون به عنوان مایه استفاده گردید. نهال‌های مایه‌زنی شده تا حدود دو ماه به صورت روزانه مورد بازبینی قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور استخراج دی‌ان‌ا، هر جدایه روی محیط آگار غذایی حاوی عصاره مخمر کشت شده و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، سوسپانسیون نیمه‌کدری از باکتری در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر پتاس (KOH) پنج درصد به آن اضافه گردید. سپس به منظور لیز شدن بهتر سلول‌های باکتری میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون به مدت پنج دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون مذکور به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، از محلول رونشین در واکنش PCR استفاده شد. از آغازگرهای اختصاصی F1 (5′-CCTGCGCCATGTTGCCAGATCGCTAT-3′)

Archive of SID

www.SID.ir

و C3 (5′-ACCTGAGTAGCAGTTTCGACTATTT-3′) برای شناسایی *B. nigrifluens* استفاده شد (Loreti *et al*. 2008).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۵ پیکومول از هر آغازگر، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۲ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X (500 mM KCl, Tris-HCl (اسیدیته ۸/۴))، ۰/۱۶ میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs)، دو میکرولیتر از دی‌انا ژنومی و ۱/۲۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (*Taq* Polymerase) (سیناژن، ایران) و در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf gradient, Germany) انجام شد.

واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی دی‌انا ژنومی در دمای C ° ۹۴، به مدت یک دقیقه؛ اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۶ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه؛ گسترش رشته جدید در دمای C ° ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه انجام شده و در پایان گسترش نهایی در دمای C ° ۷۲ به مدت پنج دقیقه انجام شد.

تعیین ترادف ناحیه 16S rDNA و آنالیز فیلوژنیکی

به منظور بررسی کارایی و فراگیری آغازگرهای معرفی شده توسط *لورتی و همکاران* (Loreti *et al*. 2008) با استفاده از آغازگرهای 16F27 (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3′) و 16R1525 (5′-TTCTGCAGTCTAGAAGGAGGTGWTCCA GC-3′) ترادف 16S rDNA یک جدایه از جدایه‌های PCR^+ و سه جدایه PCR^- تکثیر شد (Poza-Carrion *et al*. 2008; Hauben *et al*. 1997). علاوه بر آغازگرهای پیشین، دو آغازگر Bn16SF (5′-AGGCAGCAGTGGGGAAT-3′) و Bn16SR (5′-TACTCGTAAGGGCCATGATGA-3′) بر اساس ترادف‌های به دست آمده از ترادف‌یابی با آغازگرهای 16F27 و 16R1525 و با استفاده از برنامه oligo 5 طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد و برای تعیین ترادف بخش میانی قطعه 16S rDNA به کار برده شد.

قطعات ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج دی‌انا (Fermentas, Lithuania) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگاروز استخراج و برای تعیین ترادف به شرکت Macrogene کشور کره جنوبی ارسال گردید. ترادف‌های همولوگ ناحیه 16S rDNA مربوط به گونه‌های خانواده Entrobacteriaceae از سایت NCBI (National Information Center for Biotechnology) (http://www4.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت و با ترادف 16S rDNA جدایه‌های F7، G5، KE4 و M5 با استفاده از نرم افزار GenDoc همردیف شد. درخت فیلوژنتیکی نیز با استفاده از نرم افزار TreeCon با الگوریتم اتصال مجاور (Neighbor- joining) رسم شد و آزمون صحت شاخه‌ها (Bootstrapping) با استفاده از نرم افزار Mega 4 با ۱۰۰۰ تکرار بررسی شد.

نتایج و بحث

نمونه‌برداری و جداسازی

جداسازی پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط EMB-Agar انجام شد و برای بررسی‌های بعدی روی محیط آگار غذایی حاوی سوکروز کشت شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های مقدماتی جدایه‌های گرم و اکسیداز منفی،

Archive of SID

www.SID.ir

دارای توانایی رشد بی‌هوازی، عدم توانایی ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ توتون و لهانیدن سیب زمینی و عدم تولید رنگ فلورسنت روی محیط King's B و رنگدانه صورتی روی محیط YDC، ۷۱ جدایه برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. اسامی، محل و زمان جمع‌آوری جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

هیچ کدام از جدایه‌ها توانایی تولید اندول، هیدرولیز ژلاتین و تولید آرژنین دی‌هیدرولاز را نداشتند. نتیجه آزمون‌های اوره‌آز، تولید لوان و هیدرولیز نشاسته در جدایه‌های مختلف، متفاوت بود. واکنش‌های تولید H_2S از سیستئین، رشد روی محیط کشت حاوی چهار درصد نمک طعام (NaCl) و هیدرولیز اسکولین در کلیه جدایه‌ها مثبت بود (جدول ۲). این ویژگی‌ها با خصوصیات گونه *B. nigrifluens* مطابقت داشت (Schaad *et al.* 2001).

هیچ کدام از جدایه‌ها روی محیط YDC رنگدانه صورتی تولید نکردند، از این ویژگی می‌توان برای متمایز کردن این گونه از گونه *B. rubrifaciens* استفاده نمود (Wilson *et al.* 1967; Schaad & Wilson 1971). نتایج آزمون لهیدگی سیب‌زمینی با بررسی‌های انجام شده توسط *برادران و قاسمی* (Baradaran & Ghasemi 2004) و *ساکاردی و همکاران* (Saccardi *et al.* 1998) تطابق داشت ولی با نتایج یوسفی *کوپایی و همکاران* (Yousefi Kopaei *et al.* 2007) که ۱۴/۲ درصد از جدایه‌ها را قادر به ایجاد لهیدگی ضعیف اعلام نموده‌اند، تفاوت داشت.

هیچ کدام از جدایه‌ها قادر به استفاده از مالونات نبودند. همه جدایه‌ها از مانیتول استفاده کردند ولی در استفاده از سوربوز، رامنوز، رافینوز، آرابینوز، مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز، فرمات، سیترات، تارتارات و سالیسین متغیر عمل نمودند. جدایه‌های PCR^+ در بسیاری از ویژگی‌ها یکسان بوده و کمتر از ۲۵ درصد آنها در تولید اسید و باز از چند منبع کربنی تفاوت داشتند (جدول ۲). نتایج این آزمون‌ها به جز آزمون‌های تولید اسید از رافینوز و سلوبیوز با نتایج اعلام شده توسط *حریقی و رحیمیان* (Harighi & Rahimian 1997)، *یوسفی کوپایی و همکاران* (۲۰۰۷) *جمالزاده و همکاران* (Jamalzade *et al.* 2009)، *برادران و قاسمی* (۲۰۰۴) و *حریقی* (Harighi 2006) مطابقت دارد. توانایی مصرف برخی از کربوهیدرات‌ها توسط برخی باکتری‌های بیمارگر گیاهی در اثر کشت‌های مکرر در محیط‌های غذایی تغییر می‌نماید (Scortichini & Rossi 1995).

عمده جدایه‌های PCR^+ اوره‌آز تولید کردند در حالی که بقیه جدایه‌ها این قابلیت را نداشتند. جدایه‌های بررسی شده در مطالعه *مورتی و همکاران* (Moretti *et al.* 2007) نیز در این ویژگی واکنش متغیر نشان دادند ولی تمامی جدایه‌های بررسی شده در مطالعه *یوسفی کوپایی* (۲۰۰۷) و *حریقی* (۲۰۰۶) اوره‌آز مثبت بودند. اختلاف در واکنش اوره‌آز جدایه‌های بررسی شده در پژوهش حاضر در مقایسه با جدایه‌های بررسی شده در دو مطالعه اخیر می‌تواند ناشی از گسترده‌تر بودن مناطق نمونه‌برداری باشد.

در جدایه‌های PCR^+ نتایج آزمون‌های تولید لوان، هیدرولیز نشاسته، استفاده از سوربوز، فرمات، مالتوز، رافینوز، تارتارات و سیترات منفی بود، در حالی در جدایه‌های PCR^- نتایج این آزمون‌ها مثبت بود. به نظر می‌رسد قابلیت هیدرولیز نشاسته و تولید لوان در شناسایی گونه *B. nigrifluens* مفید باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. نام، محل و تاریخ جمع‌آوری باکتری‌های بررسی شده در این مطالعه

Table 1. Name, source and year of isolation of bacteria utilized in this study

نام جدایه Isolates	محل جمع‌آوری Source	تاریخ جمع‌آوری Date Isolated	نام جدایه Isolates	محل جمع‌آوری Source	تاریخ جمع‌آوری Date Isolated
K1*	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	G15	گلستان- دلند Golestan-Daland	اردیبهشت ۸۷ May 2008
K2*	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	G16*	گلستان- دلند Golestan-Daland	اردیبهشت ۸۷ May 2008
K3*	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	G17	گلستان- کردکوی Golestan- Kordkuy	اردیبهشت ۸۷ May 2008
K4	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	G18	گلستان- کردکوی Golestan- Kordkuy	اردیبهشت ۸۷ May 2008
K5	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	G19	گلستان- کردکوی Golestan- Kordkuy	اردیبهشت ۸۷ May 2008
K6*	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE4	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K7	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE5	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K8	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE7	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K9*	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE8	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K10	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE9	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K11	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE10	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
K12	کرمان- بافت Kerman-Baft	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE15	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
M1*	مازندران- نکا Mazandaran-Neka	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE17	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
M2*	مازندران-بادله Mazandaran-Badele	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE18	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
M3	مازندران- بادله Mazandaran-Badele	اردیبهشت ۸۷ May 2008	KE19	کرمانشاه- صحنه Kermanshah- Sahneh	خرداد ۸۷ June 2008
M4*	مازندران- بادله Mazandaran-Badele	اردیبهشت ۸۷ May 2008	M16	مازندران- بادله Mazandaran-Badaleh	شهریور ۸۳ September 2004
M5	مازندران- بادله Mazandaran-Badele	اردیبهشت ۸۷ May 2008	M17	مازندران- بهشهر Mazandaran-Behshahr	شهریور ۸۳ September 2004
M6	مازندران- بادله	اردیبهشت ۸۷	M18	مازندران- نوشهر	شهریور ۸۳

Archive of SID

www.SID.ir

September 2004	Mazandaran-Noshahr		May 2008	Mazandaran-Badele	
شهریور ۸۳	مازندران- بابل	M19	اردیبهشت ۸۷	مازندران- رستم کلا	
September 2004	Mazandaran- Babol		May 2008	Mazandaran- –Rostam Kola	M11*
شهریور ۸۳	مازندران- چابکسر	M20	اردیبهشت ۸۷	مازندران- رستم کلا	M12
September 2004	Mazandaran-Chaboksar		May 2008	Mazandaran-Rostam Kola	
شهریور ۸۳	مازندران- تنکابن	M21	اردیبهشت ۸۷	مازندران- رستم کلا	
September 2004	Mazandaran-Toncabon		May 2008	Mazandaran-Rostam Kola	M13
شهریور ۸۳	مازندران- بادله	M22	اردیبهشت ۸۷	مازندران- رستم کلا	
September 2004	Mazandaran –Badele		May 2008	Mazandaran-Rostam Kola	M15
شهریور ۸۳	مازندران-بادله	M23	اردیبهشت ۸۷	گلستان- گرگان	G1
September 2004	Mazandaran –Badeleh		May 2008	Golestan- Gorgan	
بهار ۸۱	فارس- بوانات	F1*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- گرگان	G2*
Spring 2002	Fars- Bovanat		May 2008	Golestan- Gorgan	
بهار ۸۱	فارس- بوانات	F2*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- مینودشت	G3
Spring 2002	Fars- Bovanat		May 2008	Golestan-Minoo Dasht	
بهار ۸۱	فارس- اقلید	F3*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- مینودشت	G4
Spring 2002	Fars- Eqlid		May 2008	Golestan-Minoo Dasht	
بهار ۸۱	فارس- اقلید	F4*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- مینودشت	G5
Spring 2002	Fars- Eqlid		May 2008	Golestan-Minoo Dasht	
بهار ۸۱	فارس- اقلید	F5*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G6
Spring 2002	Fars- Eqlid		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	فارس- دشتک	F6*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G7*
Spring 2002	Fars- Dashtak		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	فارس- دشتک	F7*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G8
Spring 2002	Fars- Dashtak		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	فارس- حصارک	F8*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G19
Spring 2002	Fars- Hesarak		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	فارس- حصارک	F9*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G10
Spring 2002	Fars- Hesarak		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	فارس- منصورآباد	F10*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G11
Spring 2002	Fars- Mansour-Abad		May 2008	Golestan-Daland	
بهار ۸۱	کهگیلویه و بویراحمد- یاسوج	KO*	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G12
Spring 2002	Kohgiluyeh-va-Boyerahmad- Yassuj		May 2008	Golestan-Daland	
			اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G13
			May 2008	Golestan-Daland	
خرداد ۸۴	کردستان- سنندج	KU	اردیبهشت ۸۷	گلستان- دلند	G14*
June 2005	Kurdistan-Sanandaj		May 2008	Golestan-Daland	

*: جدایه‌هایی که قطعه ۲۵۵ جفت بازی در آنها تکثیر شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌های بررسی شده در این مطالعه

Table 2. Phenotypic characterization of isolation of bacteria utilized in this study

جدایه‌های مشابه *B. nigrifluens* (PCR⁻) *B. nigrifluens* like isolates (PCR⁻)	جدایه‌های *B. nigrifluens* (PCR⁺) *B. nigrifluens* isolates (PCR⁺)	ویژگی Characteristic
–	–	گرم Gram reaction
–	–	اکسیداز oxidase
+	+	رشد هوازی/بیهوازی Oxidative and facultative anaerobic
–	–	لهانیدن سیب زمینی Potato rot
–	–	تولید رنگدانه سبز فلورسنت در محیط King's B florescent pigment on King's-B medium
–	–	تولید رنگدانه‌ی صورتی روی محیط YDC Pink pigment on YDC
–	+	آزمون بیماری‌زایی Pathogenicity test
–	–	تولید اندول Indole production
+	+	تولید گاز H_2S از سیستئین H2S from cysteine
–	–	آرژنین دهیدرولاز Arginine dihydrolase
+ (۸۴ درصد) + (84 %)	+ (۸۷/۵ درصد) + (87.5 %)	اوره‌آز Urea hydrolysis
+	–	هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis
+	+	هیدرولیز اسکولین Esculin hydrolysis
–	–	هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis
+	+	رشد در محیط حاوی چهار درصد نمک طعام Tolerance of NaCl 4%
+	–	تولید لوان Levan formation
		تولید اسید یا باز از : Acid or base from:
+ (۸۹ درصد) + (89 %)	– (۹۶ درصد) - (96 %)	سوربوز Sorbose

Archive of SID

www.SID.ir

مالتوز Maltose	– –	+ (۷۹ درصد) + (79 %)
رافینوز Raffinose	– (۷۹ درصد) –(79 %)	+ (۸۷ درصد) + (87 %)
فرمات Formate	– (۷۹ درصد) –(79 %)	+ (۷۵ درصد) + (75 %)
ال- تارتارات L- tartarate	– (۹۶ درصد) –(96 %)	+ (۵۷ درصد) + (57%)
سیترات Citrate	– –	+ (۷۶ درصد) + (76 %)
دی- مانیتول D-Mannitol	+ +	+ +
مالونات Malonate	– –	– –
سالیسین Salicin	+ (۹۶ درصد) + (96 %)	+ (۸۹ درصد) + (89 %)
ال- رامنوز L-Rhamnose	+ (۷۹ درصد) + (79 %)	+ (۸۹ درصد) + (89 %)
ال- آرابینوز L-Arabinose	+ (۷۵ درصد) + (75 %)	+ (۹۲ درصد) +(92 %)
دی- سلوبیوز D- cellobiose	– –	– (۹۰ درصد) –(90%)
لاکتوز Lactose	– –	– (۶۶ درصد) - (66 %)

الگوی پروتئین‌های سلولی

مقایسه الگوی پروتئین‌های سلولی مشخص نمود که جدایه‌ها الگوی نسبتاً مشابهی داشتند و تنها در نوارهای معدودی بین آنها تفاوت وجود داشت. بر این اساس جدایه‌ها به دو گروه تقسیم شدند (نتایج نشان داده نشده است) که با دسته‌بندی جدایه‌ها بر پایه‌ی ویژگی‌های فنوتیپی تطابق داشت.

آزمون بیماری‌زایی

هشت هفته پس از تزریق سوسپانسیون جدایه F7 (PCR^+) به سرشاخه‌های جوان نهال‌های گردوی ایرانی لکه‌های آبسوخته و زخم پیش رونده‌ای در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده دیده شد، ولی علائم مشاهده شده مشابه زخم‌هایی که در طبیعت مشاهده می‌شود، نبود. هیچ علامتی در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های G5، KE4 و M5 (PCR^-) و شاهد دیده نشد. با مشاهده علائم مذکور مقداری از بافت به وسیله تیغ سترون جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر، در چند قطره آب سترون خرد گردید. سوسپانسیون حاصل برای جداسازی مجدد بیمارگر روی محیط آگار غذایی کشت شد. پرگنه‌های حاصل روی محیط کشت EMB مخطط گردیدند و باکتری بیمارگر مجدداً از بافت مایه‌زنی شده

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی شد (شکل ۱). مشکلات ایجاد زخم‌های خارجی اغلب در مایه‌زنی گیاهان چوبی توسط باکتری‌هایی مانند *B. nigrifluens*، *B. rubrifaciens* و *B. quercina* مشاهده شده است (Gonzalez *et al.* 2002; Wilson *et al.* 1957). این مشکلات ناشی از وضعیت فیزیولوژیکی بافت‌ها در زمان مایه‌زنی و شرایط محیطی بعد از آن می‌باشد (Yousefi Kopaei *et al.* 2007).

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *B. nigrifluens*

از آغازگرهای اختصاصی *B. nigrifluens* (F1 و C3) برای تشخیص همه جدایه‌ها استفاده شد. قطعه مورد نظر به طول ۲۵۵ جفت باز در ۲۴ جدایه تکثیر شد که PCR^+ نامیده شدند و به طور قطعی به عنوان گونه *B. nigrifluens* شناسایی شدند (شکل ۲ و جدول ۱). به نظر می‌رسد بیشتر باکتری‌های جدا شده از درختان دارای علائم زخم *B. nigrifluens* نبوده و احتمالاً گونه(ها)ی نزدیک به آن می‌باشد که براساس آزمون بیماری‌زایی و یا استفاده از آغازگرهای اختصاصی به طور قاطع قابل تفکیک‌اند. در پژوهش انجام شده در شمال و نواحی مرکزی ایتالیا از ده باغ ۲۸ نمونه دارای علائم بیماری زخم پوستی، فقط چهار جدایه *B. nigrifluens* جداسازی شده است. به علاوه تعدادی باکتری گرم منفی غیربیماری‌زا روی گردو شامل *Pectobacterium cypripedii*، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، *Pantoea agglomerans*، *Pantoea* spp.، *Pectobacterium rhapontici*، *Ralstonia pickettii* و چند باکتری ناشناخته دیگر از زخم‌های گردو جدا شده است (Moretti *et al.* 2007).

آنالیز فیلوژنی بر اساس ترادف ناحیه 16S rDNA

ترادف ناحیه 16S rDNA یک جدایه PCR^+ (جدایه F7) و سه جدایه PCR^- (G5، KE4 و M5) تکثیر و تعیین شد. به منظور تعیین موقعیت فیلوژنیکی این جدایه‌ها در خانواده Enterobacteriaceae ترادف این جدایه‌ها با ترادف گونه‌های نزدیک موجود در NCBI مقایسه شد. نتایج نشان داد جدایه F7 با جدایه FJ611884 گونه *B. nigrifluens* در سطح ۹۶/۸ درصد مشابهت داشت در حالی که سه جدایه دیگر در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. جدایه‌های M5، KE4 و G5 به ترتیب ۹۴/۴، ۹۰/۵ و ۸۸/۸ درصد به جدایه FJ611884 گونه *B. nigrifluens* شباهت داشتند که کمتر از میزان شباهتی می‌باشد که بتوان آنها را متعلق به این گونه قلمداد کرد (جدول ۳ و شکل ۳). این یافته نشان می‌دهد که آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط لورتی و همکاران (۲۰۰۸) کارایی کافی را برای ردیابی جدایه‌های *B. nigrifluens* دارند.

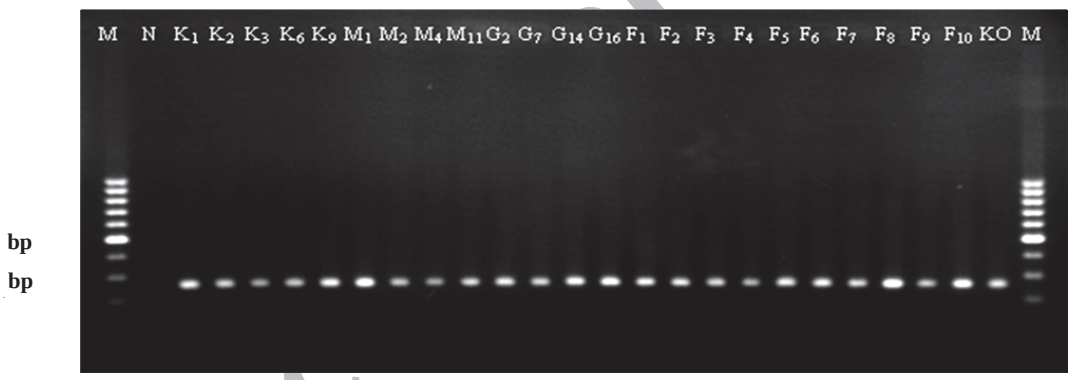
استفاده از آغازگرهای اختصاصی *B. nigrifluens* صحت، سرعت و دقت تشخیص بیمارگر از دی‌انا ژنومی، سلول‌های باکتری و بافت‌های آلوده را افزایش می‌دهد. از آن جایی که روش‌های مبتنی بر آزمون‌های بیوشیمیایی و بیماری‌زایی روی نهال‌های گردو (Schaad *et al.* 2001) بسیار زمان‌بر بوده و باکتری بیمارگر در موارد زیادی از بافت‌های دارای علائم جدا نمی‌شود، به علاوه از آزمون اوره‌آز نیز نمی‌توان در مجموعه آزمون‌های افتراقی استفاده نمود، به نظر می‌رسد آزمون‌های فنوتیپی افتراقی شامل کشت روی محیط EMB-Agar، آزمون‌های گرم، اکسیداز، واکنش هوازی و بیهوازی، تولید لوان و هیدرولیز نشاسته به همراه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱. علائم ایجاد شده توسط جدایه *Brenneria nigrifluens* F7 (PCR^+) بر سرشاخه جوان گیاهچه گردوی ایرانی هشت هفته پس از مایه‌زنی.

Fig. 1. Symptoms exhibited eight weeks after inoculation by *Brenneria nigrifluens* F7 isolate (PCR^+) on Persisan walnut seedlings.



شکل۲. الگوی باند حاصل از ۲۴ جدایه PCR^+ با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی گونه *Brenneria nigrifluens* (F1 و C3) روی ژل یک درصد آگاروز. (N): کنترل منفی، جدایه‌های *B. nigrifluens* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شامل K (کرمان)؛ M (مازندران)؛ G (گلستان)؛ F (فارس)؛ KO (کهگیلویه و بویراحمد)، (M): استاندارد جرم مولکولی (GeneRuler ^{TM} 100bp DNA-Ladder).

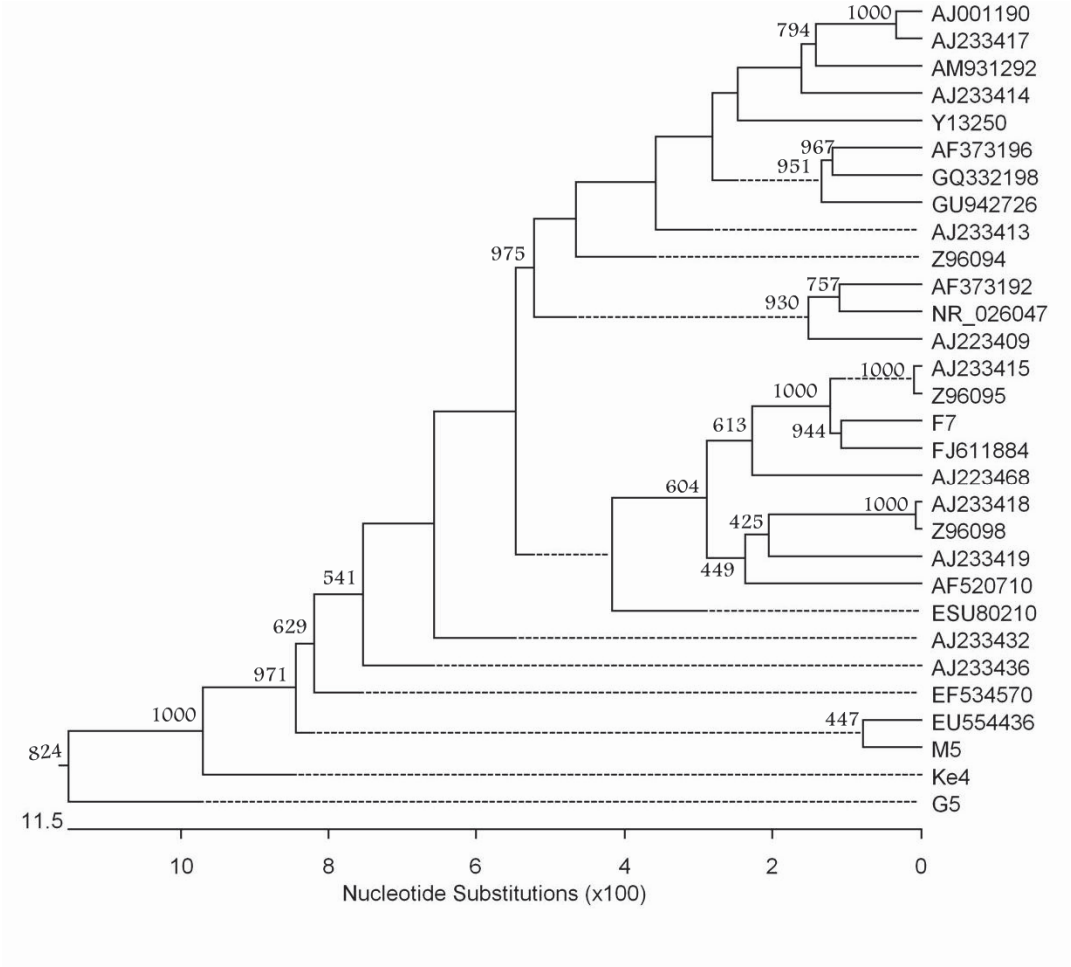
Fig. 2. Gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified of 24 PCR^+ isolates using specific *Brenneria nigrifluens* primer pairs (F1 and C3) on 1% agarose gel. N: Negative control; K: Kerman; M: Mazandaran; G: Golestan; F: Fars; KO: Kohgiluyeh-va-Boyerahmad; M: molecular marker GeneRuler^{TM} 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, Lithuania).

www.SID.ir

جدول ۳. ضریب تشابه ترادف ناحیه S 16S rDNA یک جدایه PCR^+ (جدایه F7) و سه جدایه PCR^- (G5، KE4 و M5) با برخی از جدایه‌های خانواده Enterobacteriaceae موجود در بانک اطلاعات NCBI

Table 3. Similarity values determined from pairwaise comparsions among 16S rDNA sequences of one PCR^+, three PCR^- and Enterobacteriaceae (from NCBI) isolates.

www.SID.ir



شکل۳. دندروگرام قرابت ترادف ناحیه 16S rDNA، یک جدایه PCR^+ (جدایه‌ی F7) و سه جدایه PCR^- (G5، KE4 و M5) با برخی از جدایه‌های خانواده Enterobacteriaceae موجود در بانک اطلاعات NCBI.

Fig. 3. Dendrogram depicting the estimated phylogenetic relationships among Enterobacteriaceae isolates, based on pairwise comparisons of nearly complete 16S rDNA sequences. AJ001190 (*Erwinia persicinus*); AJ233417 (*Erwinia rhapontici*); AM931292 (*Erwinia pyrifoliae*); AJ233414 (*Erwinia mallotivora*); Y13250 (*Erwinia tracheiphil*); Y13250 (*Erwinia tracheiphila*); AF373196 (*Pantoea agglomerans*); GQ332198 (*Pantoea ananatis*); GU942726 (*Pantoea stewartii*); AJ233413 (*Erwinia cypripedii*); Z96094 (*Erwinia cyrpipedii*); AF373192 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *Odoriferum*); NR_026047 (*Pectobacterium wasabiae*); AJ223409 (*Pectobacterium cacticidum*); AJ233415 (*Brenneria nigrifluens*); Z96095 (*Brenneria nigrifluens*); F7; FJ611884 (*Brenneria nigrifluens*); AJ223468 (*Brenneria alni*); AJ233418 (*Brenneria rubrifaciens*); Z96098 (*Brenneria rubrifaciens*); AF520710 (*Dickeya paradisiaca*); ESU80210 (*Brenneria salicis*); AJ233432 (*Serratia odorifera*); AJ233436 (*Serratia rubidaea*); EF534570 (*Brenneria quercina*); EU554436 (*Brenneria quercina*); M5; KE4; G5

www.SID.ir

F1 و C3 کوتاه‌ترین راه ممکن برای شناخت بیمارگر بوده و کارایی لازم را برای رعایت بهداشت زراعی در یک منطقه و هم‌چنین پایش شیوع بیماری دارد.

از آنجایی‌که کارایی ترادف 16S rDNA برای بررسی فیلوژنی در خانواده Enterobacteriaceae در سطح جنس پایین است (Naum *et al*. 2008) برای تعیین دقیق گونه جدایه‌های PCR$^-$ (G5، KE4 و M5) آنالیز ترادف‌های نوکلئوتیدی چند ژن خانه‌داری (Multilocus Sequence Analysis, MLSA) و ترادف‌های پیوسته (Concatenated sequences) نیاز است (Young and Park 2007).

سپاسگزاری

از آقایان دکتر سید محسن تقوی و دکتر بهروز حریقی برای در اختیار قرار دادن برخی از جدایه‌های باکتری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (95-93) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir