

شناسایی عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار و مطالعه خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی آن در استان‌های فارس و کرمان*

Identification of the causal agent of angular leaf spot disease of cucumber and studying its phenotype characteristics and genetic diversity in Fars and Kerman provinces

فاطمه موحدی پاریزی، سید محسن تقوی^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰)

چکیده

طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱، ۱۱ جدایه از گلخانه‌های خیار در استان کرمان و ۱۴ جدایه از گلخانه‌های خیار در استان فارس به عنوان عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، تغذیه‌ای و تکثیر قطعه‌ی ۵۶۰ bp توسط آغازگر D21 و D22 مورد بررسی قرار گرفتند و به عنوان *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* شناسایی شدند. همچنین به منظور بررسی تنوع جدایه‌ها آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX و ERIC صورت گرفت. جدایه‌های به دست آمده بر اساس آزمون‌های گروه LOPAT و GATa مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی، با استفاده از نرم-افزار NTsys-PC نشان داده شد که جدایه‌های *PsI* جدا شده از استان‌های فارس و کرمان از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به هم شبیه بوده و با جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۸/۸٪ و با *P. fluorescens* ۵۰٪ شباهت داشتند. در آزمون بیماری‌زایی، پس از ۷ تا ۱۴ روز علائم سبزرودی، آبسوختگی و لکه زاویه‌ای دیده شد. جدایه‌های مورد نظر پس از مایه‌زنی به دیگر اعضای خانواده‌ی کدوئیان نظیر کدو، خربزه، هندوانه و طالبی نیز علائم را نشان دادند، با این وجود علائم لکه زاویه‌ای در خیار بسیار واضح‌تر نسبت به بقیه بود. این باکتری بر روی گیاهان دیگری نظیر گوجه‌فرنگی، بادمجان و فلفل نیز مایه‌زنی شد، اما هیچ گونه علائم مشخصی دیده نشد. جدایه‌های مربوطه در این پژوهش از لحاظ فنوتیپی همگن بوده ولی براساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از تنوع ژنتیکی آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX و Eric به چهار گروه تقسیم شدند که این گروه‌بندی با منشا جغرافیایی جدایه همبستگی نداشت.

کلیدواژه: بیماری لکه زاویه‌ای، خصوصیات فنوتیپی، تنوع ژنتیکی، خیار

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

مقدمه

بتوان آن‌ها را در سطح گونه از یکدیگر جدا کرد. به همین دلیل در سال ۱۹۷۴ تمامی گونه‌هایی که به این طریق توصیف شده بودند در یکدیگر ادغام شده و در گونه *Ps* قرار گرفته و در مقابل، هر یک از گونه‌های فوق به عنوان یکی از پاتوارهای *Ps* تلقی گردیدند (Hirano and Upper, 1990). عنوان پاتوار در ابتدا توسط دای و همکاران پیشنهاد گردید (Dye et al., 1980).

هدف از این پژوهش شناسایی عامل بیماری لکه زاویه-ای خیار در گلخانه‌های استان فارس و کرمان، بررسی خصوصیات فنوتیپی *P. syringae* pv. *Lachrymans* و همچنین تعیین تنوع ژنتیکی این باکتری در بین جدایه‌های مختلف استفاده از روش *rep-PCR* در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تشخیص

طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۱، در بازیدهایی که از گلخانه‌های استان‌های فارس و کرمان به عمل آمد برگ‌های خیار دارای لکه‌های زرد و آبرسوخته که محدود به رگبرگ‌ها شده، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی کامل برگ‌های دارای علائم بیماری با آب مقطر سترون و له نمودن آنها درون هاون سترون حاوی آب مقطر سترون، از مایع به دست آمده، روی محیط کشت King B کشت گردید و در تشتک‌های پتری به مدت ۲-۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و پرگنه‌های کرم رنگ جداسازی و خالص شدند. به منظور بررسی حضور باکتری در بذرها، آنها را درون آب مقطر استریل قرار داده و پس از له نمودن درون هاون، از عصاره بدست آمده بر روی محیط کشت KB کشت گردید و خالص-

بیماری لکه زاویه‌ای خیار توسط *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* ایجاد می‌شود (Smith and Bryan, 1915). علائم این بیماری به صورت لکه‌های زرد و یا سبز زرد می‌باشد و از آنجاییکه به رگبرگ‌ها محدود می‌شود، لکه زاویه‌ای نام گرفته است. سطح زیر کشت خیار در ایران در سالهای ۲۰۱۱ و ۲۰۱۲ به ترتیب، ۶۳۶۵۲ هکتار و ۷۰۰۰۰ هکتار می‌باشد (FAOSTAT 2012). در استان‌های فارس و کرمان به دلیل داشتن شرایط آب و هوای گرم و نسبتاً خشک برخی محصولات کشاورزی همچون خیار در گلخانه‌ها کشت می‌شوند، از اینرو بیماری‌هایی که نیاز به دما و رطوبت بالایی دارند در گلخانه‌ها شیوع بیشتری پیدا می‌کنند، یکی از این بیماری‌ها، بیماری باکتریایی لکه زاویه‌ای خیار می‌باشد که در گلخانه‌های خیار این دو استان به چشم می‌خورد که باعث خسارت کمی و کیفی می‌شود. در ایران باکتری *P. syringae* pv. *Lachrymans* از طالبی (رقم شهد شیراز) از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی در باجگاه، در شرایط مزرعه با آبیاری بارانی جدا و گزارش شده است (Banhashemi, 1971). همچنین برخی صفات فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای آن در سال ۲۰۰۷ از کردستان گزارش شده است (Harighi, 2007). گونه *Pseudomonas syringae* (Ps) با دارا بودن بیش از ۵۷ پاتوار، به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های موجود در این جنس تلقی می‌گردد (Yaish, 2006). ترجیح میزبانی به عنوان خصوصیت مهمی تلقی گردید که به دانشمندان اجازه داد که باکتری‌های مشابه از لحاظ خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی را از یکدیگر جدا کنند. از طرف دیگر شباهت‌های این افراد با یکدیگر بیش از آن است که

سازی انجام گرفت. از تارتارات بر اساس روش شاد و همکاران انجام گرفت (Schaad *et al.*, 2001).

آزمون اثبات بیماریزایی

برای اثبات بیماریزایی و تعیین دامنه میزبانی این باکتری بذرگیاهان مختلف از خانواده کدویان همچون: خیار، کدو، هندوانه، خربزه، طالبی کشت شدند. همچنین از خانواده سولاناسه، نیز گیاهانی نظیر: گوجه‌فرنگی، فلفل، بادنجان کشت شدند. پس از رشد بذرها و رسیدن آنها به مرحله ۳ تا ۴ برگی، مایه‌زنی انجام گرفت.

برای مایه‌زنی از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری مورد نظر سوسپانسیون به غلظت 10^7 cfu/ml (با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر سترون تهیه شد و پس از پاشیدن پودر کاربراندوم بر روی سطح برگ‌ها، این سوسپانسیون نیز بر روی سطح برگ‌ها پاشیده شد. به منظور حفظ رطوبت و ایجاد شرایط مناسب برای رشد باکتری، روی گلدان‌ها با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد و به مدت ۱ تا ۲ هفته در این حالت قرار گرفتند و روزانه بازرسی شدند. پس از گذشت این مدت زمان، با مشاهده علائم مربوط به بیماری، برگ‌های دارای علائم از بوته‌های گیاه میزبان جدا شده و به آزمایشگاه منتقل شدند و مراحل جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری صورت گرفت.

آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای

آزمون اکسیداز بر اساس روش کواکس (Kovacs, 1956) و آزمون‌های گرم، گروه LOPAT: لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز آرژنین و توانایی ایجاد فوق حساسیت در توتون، کاتالاز و همچنین آزمون‌های گروه GATTA، هیدرولیز ژلاتین، آسکولین، تیروزیناز و استفاده

استخراج DNA ژنومی

استخراج به روش تیمار با SDS و رسوب با ایزوپروپانول انجام شد (Gomes *et al.*, 2000).

تشخیص باکتری با آغازگرهای اختصاصی

به منظور ردیابی *Psi* از آغازگر اختصاصی D21 و D22 استفاده شد.

D21 (5'-AGC CGT AGG GGAACC TGC GG-3')
D22 (5'-TGA CTG CCA AGG CATCCA CC-3')
(Manceau and Horvais, 1997).

مواد مورد نیاز (محصول شرکت BIONEER) و چرخه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR طبق روش سورنسون و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت (Sorensen *et al.*, 1998).

بررسی تنوع ژنتیکی

آزمون **rep-PCR**: بدین منظور از آغازگرهای BOXA1R، ERIC1R، ERIC2، برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده استفاده گردید (Versalovic *et al.*, 1994; Versalovic *et al.*, 1991). چرخه دمایی مورد استفاده در rep-PCR شامل واسرشته شدن اولیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه (۱ چرخه)، واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳ ثانیه و با دمای ۹۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، جفت شدن آغازگر (ERIC) با دمای ۵۲ درجه و به مدت ۱ دقیقه، جفت شدن آغازگر (BOX) با دمای ۵۳ درجه سلسیوس و به مدت ۱ دقیقه، مرحله امتداد در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و به مدت ۸

باشد، که در مناطقی با رطوبت بالا خصوصاً در کشت‌های گلخانه‌ای، خسارت زیادی را به این محصول وارد می‌کند، جدایه‌های بدست آمده در این پژوهش نیز از گلخانه‌های استان فارس و کرمان بدست آمدند. شدت بیماری در گلخانه‌های مختلف، متفاوت بود به طوری‌که در گلخانه‌هایی که فاقد تهویه و یا تهویه کم بودند و میزان رطوبت در طول شبانه‌روز بالا می‌رفت، شدت علائم بیشتر دیده می‌شد، در گلخانه‌های جیرفت شدت بیماری بسیار بالا بود. در گلخانه‌های خیار از برگ‌های دارای علائم بیماری تعداد ۲۵ جدایه به دست آمد که در جدول ۱ آورده شده است. در نمونه‌برداری‌هایی که از گلخانه‌های استان فارس و کرمان طی سالهای ۱۳۹۰-۱۳۹۱ صورت گرفت، نمونه‌های دارای علائم این بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و باکتری عامل بیماری جداسازی شد. علائم بیماری شامل ایجاد لکه‌های کلروتیک و زرد با هاله‌ای آب‌سوخته که محدود به رگبرگ‌ها و حالت زاویه‌ای می‌شد و در حالت شدید بیماری، این لکه‌ها گسترش یافته و بافت‌مرده، می‌شدند، باکتری‌های جدا شده و خالص‌سازی شده از این لکه‌ها هم بر روی محیط کشت KB و هم بر روی محیط کشت NA شدند. پرگنه *Psl* رشد یافته بر روی محیط کشت KB بر خلاف بسیاری از *Pseudomonas* sp. که قادر به تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط KB هستند (Schaad et al., 2001) جدایه‌های مورد نظر، این جدایه‌ها قادر به تولید رنگدانه فلورسنت نبودند و بر روی محیط NA حاوی سوکروز حالت لعابی و سیال داشتند البته برخی از جدایه‌هایی نیز که از لهستان گزارش شدند نیز قادر به تولید رنگدانه فلورسنت روی KB نبودند (Olczak-woltman et al., 2007). همچنین در تحقیقات دیگر نیز تنها ۳/۳۷٪ از جدایه‌های *Psl* قادر به تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط KB بودند (Fatmeh et al., 2007).

دقیقه (۱ چرخه)، تعداد مراحل جفت شدن و امتداد ۳۵ چرخه بود. مواد مورد استفاده در این واکنش نیز شامل آب مقطر سترون دو بار اتوکلاوشده یا تریقی ($17/75 \mu\text{l}$)، $MgCl_2$ ($0/85 \mu\text{l}$: $1/7$ میلی‌مولار)، آغازگر مستقیم (Forward: BOX, ERIC) ($1/2 \mu\text{l}$: باغلظت ۱۰ نانوگرم) و آغازگر معکوس (Reverse) ($1/2 \mu\text{l}$: باغلظت $0/4$ میکرومولار)، DNTPs ($0/5 \mu\text{l}$: باغلظت $0/2$ میلی‌مولار)، آنزیم *Taq DNA* پلی‌مراز ($0/4 \mu\text{l}$: ۲ واحد (شرکت سیناژن))، نمونه خالص DNA ($1/5 \mu\text{l}$: باغلظت ۴۰ نانوگرم)، بافر (۱X شرکت سیناژن) می‌باشد. از نشانگر مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی DNA (شرکت سیناژن) برای تخمین وزن مولکولی قطعات تکثیر شده استفاده شد.

آنالیز داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی

فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد بر اساس نشانگرهای مولکولی، به صورت وجود (۱) یا عدم وجود نوار (۰) در ژل مشخص شد. با استفاده از نرم‌افزار (Ntsys-pc2.02) Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید (Rohlf, 2000). تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان خوشه‌ها از روش (UPGMA) Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده گردید. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، بر اساس کلیه خصوصیات ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید.

نتایج و بحث

بیماری لکه زاویه‌ای خیار از بیماری‌های مهم خیار می‌-

جدول ۱. جدایه‌های شناسایی شده *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* از استان فارس و کرمان در سال‌های ۹۰-۹۱.

Table 1. Identified isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* from Fars and Kerman provinces in 2011-2012

محل نمونه‌برداری Place of sampling	کد جدایه Isolate Code	محل نمونه‌برداری Place of sampling	کد جدایه Isolate Code
فسا: Fasa	V14	فسا: Fasa	C1
فسا: Fasa	V15	صدرا: Sadra	C2
ماهان: Mahan	V16	صدرا: Sadra	C3
جیرفت ۱: Jiroft1	V17	فسا: Fasa	C4
جیرفت ۱: Jiroft1	V18	فسا: Fasa	V5
جیرفت ۱: Jiroft1	V19	فسا: Fasa	V6
جیرفت ۱: Jiroft1	V20	صدرا: Sadra	V7
جیرفت ۱: Jiroft1	V21	صدرا: Sadra	V8
جیرفت ۱: Jiroft1	V22	فسا: Fasa	V9
ماهان: Mahan	V23	فسا: Fasa	V10
جیرفت ۱: Jiroft1	V24	فسا: Fasa	V11
جیرفت ۲: Jiroft2	V25	فسا: Fasa	V12
		ماهان: Mahan	V13

این جدایه‌ها نیز در جدول ۲ آورده شده است. با مایه‌زنی سوسپانسیون باکتری *Psl* با غلظت 10^7 cfu/ml (با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به گیاهان خیار کاشته شده در شرایط گلخانه، علائم سبزرزندی، زردی، حالت آب‌گز و بافت‌مردگی و محدود به رگبرگ‌ها، پس از ۷ تا ۱۴ روز مشاهده شد (شکل ۱). این نتیجه مشابه با نتیجه پژوهش‌های دیگر است (Olczak-Woltman, 2007). این سوسپانسیون به گیاهان دیگری نظیر: کدو، خربزه، طالبی و هندوانه مایه‌زنی شد. نحوه و شرایط مایه‌زنی *Psl* به این گیاهان همانند خیار به کار رفت. در طالبی، علائم به صورت لکه‌های زرد و بافت‌مردده و زاویه‌دار در حاشیه برگ دیده شد و در کدو، لکه‌های بافت‌مردده بیشتر در سطح پهنک برگ مشاهده شد و در خربزه، نیز علائم مشاهده شده بیشتر به صورت زردی و بافت‌مردگی در

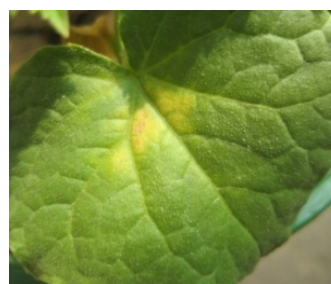
باکتری *Psl* قادر به استفاده از D(-)-tartrate نمی‌باشد (Schaad *et al.*, 2001). جدایه‌های *Psl* به دست آمده در این پژوهش نیز قادر به استفاده از D(-)-tartrate نبودند در حالیکه تمامی جدایه‌ها قادر به استفاده از قندهای: آرابینوز، سوربیتول، مانوز، رافینوز، ریبوز، گلوکز، سوکروز، سیترات، فروکتوز، مانیتول بودند (Schaad *et al.*, 2001). باکتری جدا شده از بذرهای رقم ۴۹۸ با انجام آزمون‌های فنوتیپی اولیه و اطمینان از پرگنه *Psl* مورد نظر، با انجام آزمون تشخیصی PCR برای اطمینان از حضور باکتری مورد نظر درون بذرها، باندها ۵۶۰ bp مشاهده شد که دلیل بر وجود *Psl* درون بذرها بود (شکل ۵). با شناسایی باکتری در بذرها احتمال داده می‌شود که این باکتری توسط بذرهای آلوده می‌تواند به نقاط مختلف ایران انتقال یابد. نتایج حاصل از آزمون‌های مختلف فنوتیپی و بیوشیمیایی

جدول ۲. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* در استان‌های فارس و کرمان.

Table 2. Phenotypic characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* isolates in Fars and Kerman provinces.

نتایج: Results	آزمون: Test	
-	Geram test on Geram stain	آزمون گرم بر اساس رنگ آمیزی گرم
-	Geram teat on reaction of 3% KOH	آزمون گرم بر اساس واکنش پتاس ۳٪
-	Oxidase	اکسیداز
+	Catalase	کاتالاز
+	Levan production	تولید لوآن
هوازی	Aerobic/Anaerobic	هوازی/بی‌هوازی
-	Hydrolysis of Arginine	هیدرولیز آرژینین
+	Hydrolysis of esculin	هیدرولیز آسکولین
-	Potato rot	لهانیدن سیب‌زمینی
+	Urease	اوره‌آز
-	Production of fluorescent pigment on KB	تولید رنگدانه فلورسنت روی KB
+	Hydrolysis of Tween 80	هیدرولیز توئین ۸۰
+	Salt tolerance 4%,5%,6%,3%	تحمل نمک طعام ۳٪، ۴٪، ۵٪، ۶٪
+	HR reaction on tobacco	واکنش HR بر روی توتون
-	Growth at 40°C	رشد در ۴۰ درجه سلسیوس
+	Use of citrate	استفاده از سیترات
-	Hydrolysis of starch	هیدرولیز نشاسته
+	Melt the gelatin	ذوب ژلاتین
-	Produce indole	تولید ایندول
-	Tyrosinase	تیروزیناز

حاشیه و در وسط برگ و زاویه‌دار دیده شد. در هندوانه، علائم مشاهده شده به صورت لکه‌های گرد سبزرده و زرد دیده شد (شکل ۲) با انجام آزمون تشخیصی PCR برای اطمینان از حضور باکتری مورد نظر در برگ‌های جدا شده از برگ‌های کدو، خربزه، طالبی و هندوانه، باندها ۵۶۰bp مشاهده شد که دلیل بر وجود *Psl* در برگ‌ها بود (شکل ۵). با این وجود علائم لکه زاویه‌ای در خیار بسیار واضح‌تر نسبت به بقیه بود به منظور تفکیک *Psl* از *Pss* از نظر دامنه میزبانی، به برگ‌های خیارمایه‌زنی شد، اما علائم لکه زاویه‌ای مشخص مشاهده



شکل ۱. علائم سبزردهی و زاویه‌ای در برگ خیار ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با نماینده‌ای از جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*.

Fig. 1. Chlorosis and angular symptoms on cucumber leaf, 10 days after inoculation with representative isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* on cucumber leaf.



شکل ۲. علائم مربوط به بیماری لکه زاویه‌ای خیار، ۱۰ روز پس از مایه‌زنی توسط باکتری *Psl* در طالبی، کدو، خربزه و هندوانه (از چپ به راست).

Fig. 2. Symptoms related to angular leaf spot of cucumber, 10 days after inoculation with *Psl* in pumpkin, cantaloupe, watermelon and melons (from left to right).

از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به هم شبیه بودند و با جدایه *Pss* ۸۳/۸٪ شباهت داشتند و جدایه‌های *Psl* و *Pss* با *P. fluorescens*، ۵۰٪ به هم شبیه بودند که نشان‌دهنده این بود که پاتوارهای یک گونه به هم شبیهند و با پاتوارهای دیگر تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند و میزان این تفاوت‌ها در بین گونه‌های مختلف یک جنس بیشتر مشاهده شد (شکل ۳).

ردیابی بیمارگر با استفاده از آغازگرهای D21 و D22

جهت اطمینان از تشخیص صحیح کلیه جدایه‌ها که بر اساس خصوصیات افتراقی فنوتیپی به عنوان *Psl* شناخته شده بودند، در آزمون تشخیصی PCR، با استفاده از جفت آغازگر D21 و D22 (Schaad et al., 2001, Manceau) and Horvais, 1997) که بر اساس ناحیه ITS طراحی شده است، جدایه‌ها قادر به تکثیر یک قطعه DNA با اندازه‌ی تقریبی ۵۶۰ جفت باز با آغازگر D21 و D22 بودند که مشابه با نتایج تحقیقات دیگر بود (Schaad et al., 2001).

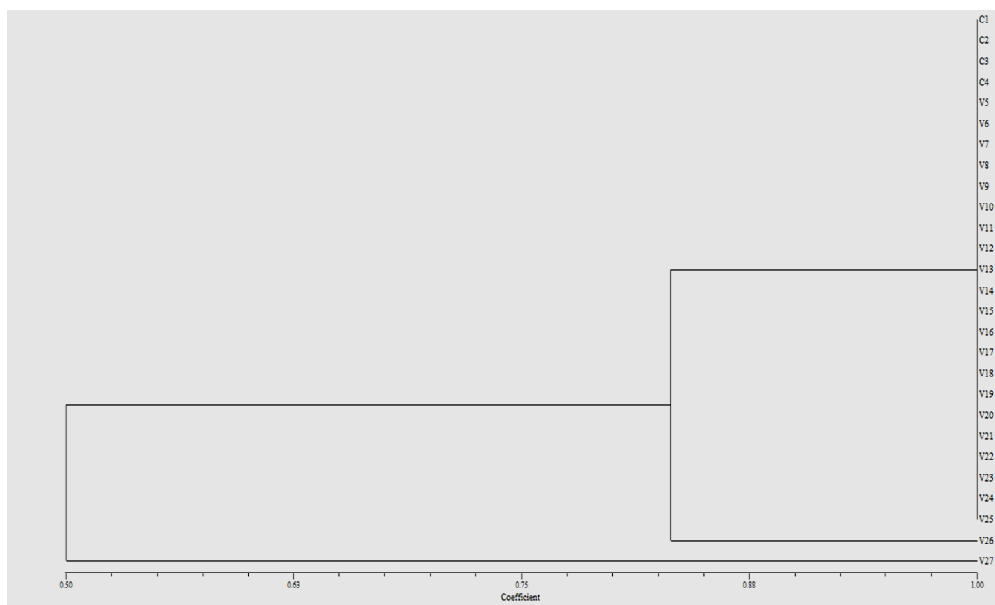
rep-PCR

با استفاده از آغازگر BOXA1R قطعاتی به اندازه‌های ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌بازی و با استفاده از آغازگر ERIC1R/ERIC2 قطعاتی اندازه‌های ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت‌بازی تکثیر

نشد. به منظور تفکیک *Psl* از *Pst* در زمینه دامنه میزبانی، *Psl* بر روی گوجه‌فرنگی نیز مایه‌زنی شد، اما هیچ‌گونه علائمی مشاهده نشد. در ضمن یک جدایه از *Psl* بر روی گیاهان دیگری نظیر بادنجان، فلفل نیز مایه‌زنی شد و در هیچ یک از میزبان‌های ذکر شده، علائم مربوطه دیده نشد و باکتری مورد نظر نیز جداسازی نگردید که این روشی به منظور تفکیک پاتوارهای مختلف یک گونه باکتری از هم می‌باشد (Schaad et al., 2001). در این مطالعه نیز پس از اینکه شباهت‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی بین جدایه‌های مختلف بررسی شد به منظور تفکیک پاتوارهای مختلف از یکدیگر از دامنه میزبانی جدایه‌ها استفاده شد که تنها *Psl* قادر به بیماری‌زایی بر روی خانواده کدویان می‌باشد و بر این اساس از پاتوارهای نزدیک جدا می‌شود.

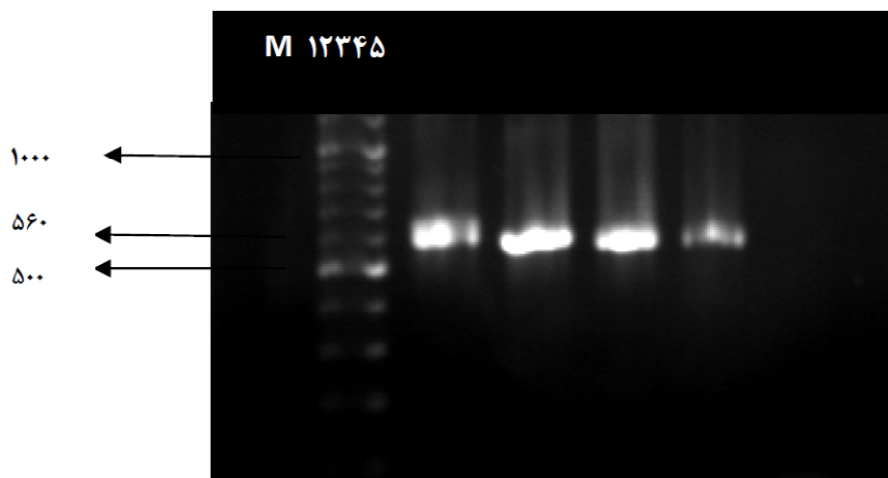
آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی

آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی با استفاده از نرم-افزار (Ntsys-pc2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید (Rohlf, 2000). بر اساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی، فیزیکی و تغذیه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc 2.02 جدایه‌های *Psl* جدا شده از فسا، صدرآ، جیرفت و ماهان به هم شبیه بوده و در واقع جدایه‌های *Psl* جدا شده از استان‌های فارس و کرمان



شکل ۳. فنوگرام ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* که جدایه‌های C1 تا V25 در جدول ۱ آورده شده است؛ V26: *P.syringae* pv. *syringae* V27: *Pseudomonas fluorescens*

Fig. 3. Phenogram of phenotypic characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* isolates characteristics of C1 to V25 are in the Table 1); V26: *P.syringae* pv. *syringae* V27: *Pseudomonas fluorescens*.

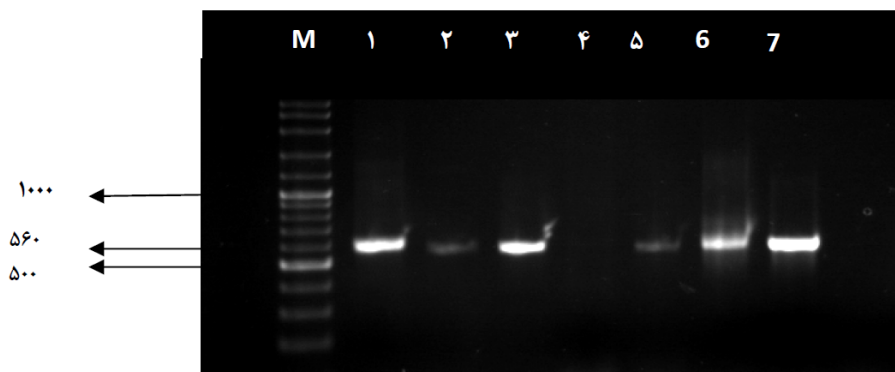


شکل ۴. نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *P. syringae* pv. *lachrymans* با استفاده از جفت آغازگر D21/D22 (M نشانگر مولکولی (۱۰۰ جفت بازی)، ۱) C1، ۲) V9، ۳) V24، ۴) V1، ۵) آب مقطر سترون.

Fig. 4. Electrophoresis patterns of PCR product of *P. syringae* pv. *lachrymans* isolates with D21/D22 primer (M) Marker (100bp), 1) C1, 2) V9, 3) V24, 4) V1, 5) Sterilized distilled water.

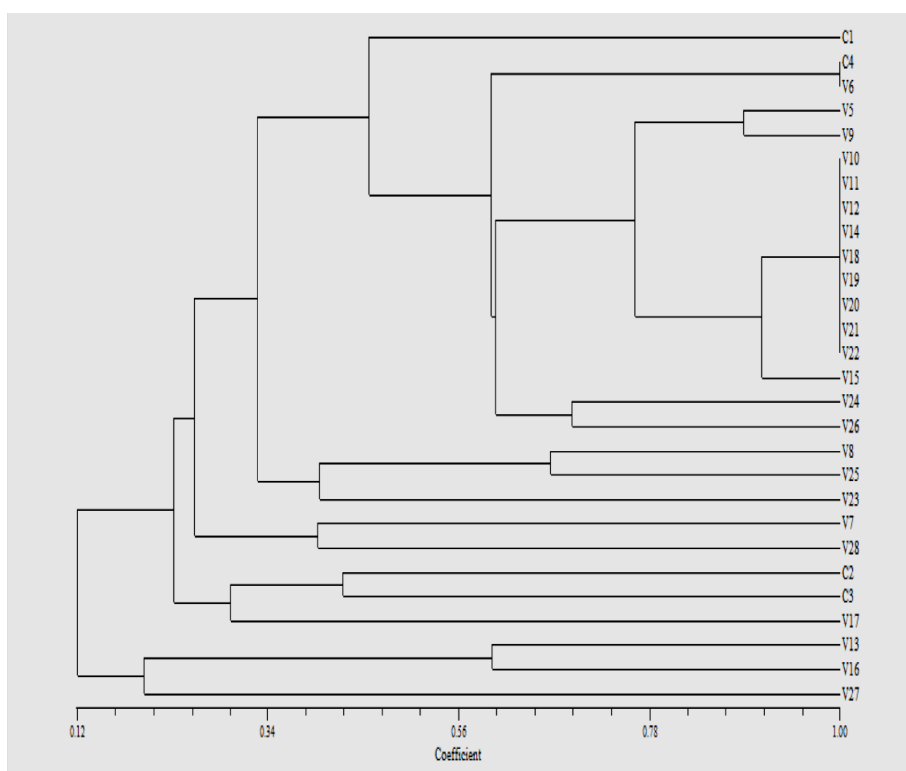
حاصل از نقوش به دست آمده از واکنش PCR rep- با استفاده از آغازگر ERIC1R/ ERIC2R جدایه به دو گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۷). در واکنش PCR rep- با

شد. آنالیز داده‌های حاصل از نقوش به دست آمده از واکنش PCR rep- با استفاده از آغازگر BOXA1R به چهار گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۶). آنالیز داده‌های



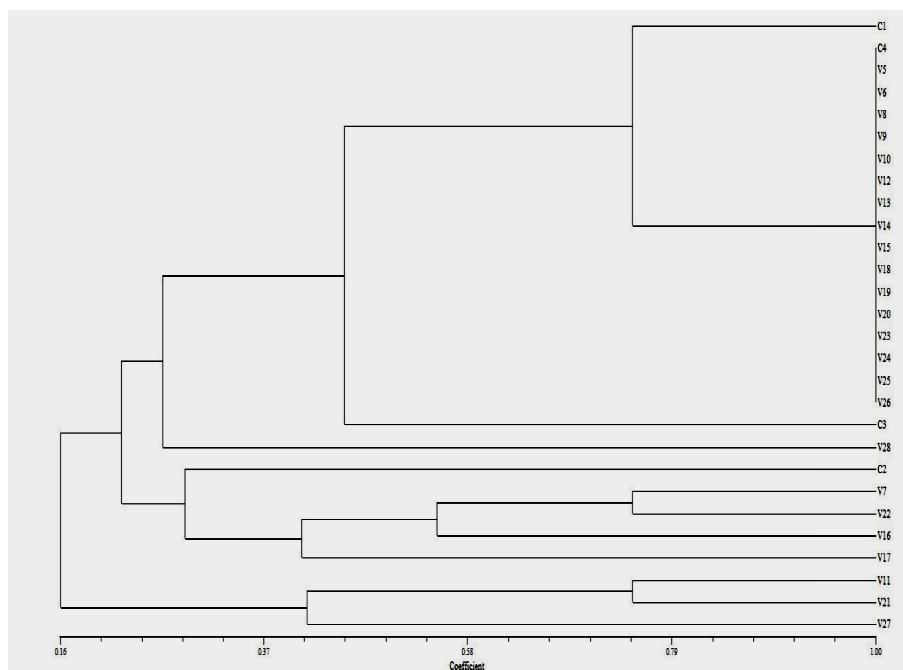
شکل ۵. نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *P. syringae pv. lachrymans* جداسازی شده از بذر خیار و همچنین برگ کدو، طالبی، خربزه و هندوانه مایه‌زنی شده با *Psl* با استفاده از جفت آغازگر (M.D21/D22) نشانگر مولکولی (۱۰۰ جفت بازی). (۱. بذر خیار، ۲) کدو، ۳) طالبی، ۴) آب مقطر سترون (۵) خربزه (۶) هندوانه (۷) خیار.

Fig. 5. Electrophoresis patterns of PCR product of *P. syringae pv. lachrymans* isolated from seed of cucumber and pumpkin, cantaloupe, melons and watermelon inoculated by *Psl* with D21/D22 primer
M) Marker (100bp), 1) seed of cucumber, 2) pumpkin, 3) cantaloupe, 4) Sterilized distilled water 5) melons 6) watermelon 7) cucumber.



شکل ۶- دندروگرام جدایه‌های *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* با استفاده از آغازگر BOXA1R مشخصات جدایه- های C1 تا V26 در جدول ۱ آمده است. (V27 *P.syringae pv. syringae* V28, *P.fluorescens*).

Fig. 6. Dendrogram of *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* isolates with BOXA1R primer (Characteristics of isolates C1 to V26 are in Table 1) V27) *P.syringae pv. syringae* , 28 *P.fluorescens*.

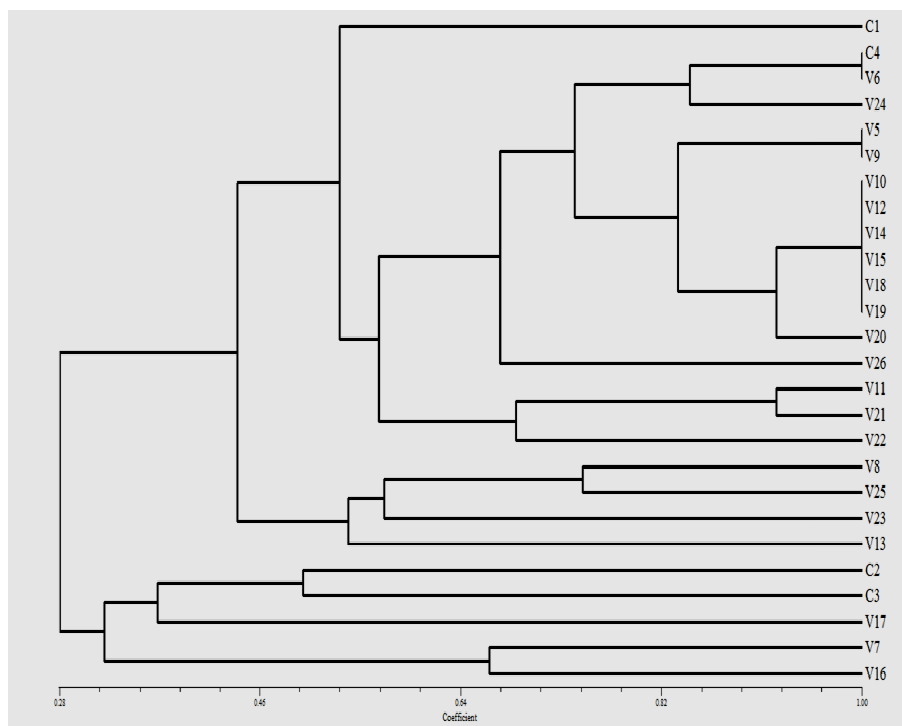


شکل ۷- دندروگرام جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* با استفاده از آغازگر ERICIR/ERIC2 مشخصات جدایه‌های C1 تا V26 در جدول ۱ آمده است. (V27: *P. syringae* pv. *syringae*, V28: *P. fluorescens*).

Fig. 7. Dendrogram of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* isolates with ERICIR/ERIC2 primer (Characteristics of isolates C1 to V26 are in Table 1). V27: *P. syringae* pv. *syringae*, V28: *P. fluorescens*.

بیماری لکه زاویه‌ای خیار که در مراکش در سال ۱۹۹۶ بر روی خربزه در شرایط گلخانه‌ای در نواحی از Agadir Souss_Massa گزارش شد، روابط بین جدایه‌های مراکشی *P. syringae* pv. *lachrymans* توسط rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP مورد بررسی قرار گرفت، در بین جدایه‌های مرتبط با جدایه‌های *P. syringae* pv. *lachrymans* که توسط rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP مورد توافق عموم بررسی شدند و دو استرین مرجع (UMG5070T و CCUGU49342) در این مطالعه استفاده شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۸ تا از ۲۰ ایزوله‌ها (۹۰٪) یک گروه مجزا را با شباهت بالاتر از ۷۰٪ ایجاد کردند. سطح پایینی از شباهت که بین این گروه و استرین‌های مرجع ثبت شده، کمتر از ۳۰٪ شباهت است و بر اساس این نتایج، نتیجه‌گیری صحیحی هم بین گروه‌بندی و

استفاده از آغازگر ERIC1R/ERIC2 و BOXA1R نیز جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند (شکل ۸). با توجه به دندروگرام‌های بدست آمده در این مرحله، می‌توان گفت استفاده از دو آغازگر اطلاعات بهتری به ما می‌دهد و در این قسمت نتایج بدست آمده با استفاده از آغازگر BOX بسیار شبیه به نتایج حاصل از هر دو آغازگر می‌باشد. تحقیقات صورت گرفته روی *Ps* نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی به میزان قابل توجهی در جمعیت‌های مختلف متفاوت است. بعضی از پاتوارها از سویه‌هایی تشکیل شده‌اند که همگی یک الگوی تقریباً مشابه دارند، اما سایر پاتوارها در برگیرنده‌ی سویه‌هایی می‌باشند که علی‌رغم اشتراک در بسیاری از قطعات سنتز شده، مقدار زیادی نیز پلی‌مورفیسم از خود نشان می‌دهند که خاص همان سویه است (Louws et al., 1995).



شکل ۸- دندروگرام جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* با استفاده از آغازگرهای ERICIR/ERIC2 و BOXA1R

Fig. 8. Dendrogram of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* with ERICIR/ERIC2 and BOXA1R primers.

شباهت بیشتری داشته باشند و در واقع شباهت ژنتیکی بین پاتوارها به منشا جغرافیایی آنها بستگی ندارد.

با توجه به اهمیت اقتصادی خیار و کاهش کیفیت و کمیت این محصول توسط *PSI* عامل لکه زاویه‌ای، با شناسایی بهتر عامل بیماری می‌توان در جهت کنترل این بیماری اقداماتی را در پیش گرفت و با توجه به حضور باکتری در بذره‌های خیار، احتمال انتقال بیماری توسط بذره‌های آلوده خیار به نقاط مختلف کشور وجود دارد که با شناسایی بذره‌های سالم و تولید بذره‌های عاری از باکتری، از گسترش بیماری لکه زاویه ای خیار می‌توان تا اندازه‌ای جلوگیری نمود.

منشا میزبانی این جدایه‌ها مشخص نشد (Fatmi *et al.*, 2008).

جدایه‌های مربوطه در این پژوهش از لحاظ فنوتیپی همگن بوده ولی براساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از تنوع ژنتیکی می‌توان گفت که از لحاظ ژنوتیپی ناهمگن می‌باشند و این تنوع به منطقه جغرافیایی بستگی ندارد که با نتایج پژوهش‌های دیگر مطابقت داشت (Fatmi *et al.*, 2008 و Olczak-Woltman *et al.*, 2007). در این پژوهش با وجود شباهت‌های زیاد بین پاتوارهای مختلف از لحاظ فنوتیپی، تفاوت‌های ژنتیکی بین آنها دیده می‌شود که ممکن است پاتوارهای مربوط به یک مکان جغرافیایی به هم شبیه نبوده اما به پاتوارهای دیگر در مکانی دیگر

منابع

- Banihashemi, Z. 1971. Bacterial angular leaf spot of Cucurbits in Iran. *Phytopath Zeit.* 72: 368-370.
- Dye, W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A. and Schroth, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59: 153-168.
- FAOSTAT. 2012. FAO Statistics Division 2012. Online <http://faostat.fao.org/site/567>.
- Fatmi, M., Bougsiba, M. and Hosni, T. 2008. Angular leaf spot of cucurbits: A Bacterial disease in expansion in Morocco. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogenes. Identification, Epidemiology and Genomics. Fatmi, M., Collmer, A., Iacobellis, N. S., Mansfield, J. W., Murillo, J., Schaad, N. W. And Ullrich, M. (eds.). Springer Press 381-390.
- Gomes, L. H., Roncato, Duarte, K. M. R., Andrino, F. G. and Tavares, F. C. A. 2008. A simple method for dna isolation from *Xanthomonas* spp. 57: 553-555.
- Harighi, B. 2007. Angular leaf spot of cucumber caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Kurdistan. *Plant Disease* 91: 789.
- Hirano, S. S. and Upper, C. D. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review Phytopathology* 28: 155-177.
- Kennedy, B. W. and Alcorn, S. M. 1980. Estimates of US crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64: 674-676.
- Klement, Z., Farkas, G. L. and Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703.
- Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M. and Fromin, N. 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S- 23S rDNA spacer. *System. Applied Microbiology* 25: 220-227.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephenes, C. T. and de Bruijn, F. J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528-536.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and diagnosis. *Annual Review Phytopathology* 37: 81-125.
- Manceau, C. and Horvais, A. 1996. Assessment of genetic diversity among isolates of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:498-505.
- Nazir, A., Bhat, K. A., Bhat, M. Y., Zargar, M. A., Teli, Muslima Nazir and Sajad M. Zargar. 2010. Current Status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber: A review. *International Journal of Current Research* 8: 1-11.
- Olczak-Woltman, H., Masny, A., Bartoszewski, G., Plucienniczak, A. and Niemirowicz-Szczytt, K. 2007. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* isolates isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology* 56: 373-382.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter software. Applied Biostatistics, NY, USA 493-505.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Edition. The American Phytopathological Society Press 373 p.
- Sorensen, K., K-H, Kim. and Takemoto, J. Y. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 226-230.
- Smith, E. F. and Bryan, M. K. 1915. Angular leaf spot of cucumbers. *Journal of Agricultural Research* 5: 465-476.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. 1991. Distribution or repetitive DNA-sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Scheneider, M., De Bruijn, F. J. and Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using

- repetitive sequence- based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
- Wiles, A. B. and J. C. Walker, 1952. Epidemiology and control of angular leaf spot of cucumber. *Phytopathology* 42: 105-108.
- Yaish, M. W. F. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* in common bean. *Euphytica* 152: 397-404.