بیماری لکه‌زاویه‌ای ختمی خواب‌آلود ناشی از یک پاتووار مشابه با *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *

ANGULAR LEAF SPOT OF SLEEPY MALLOW INCITED BY A PATHOVAR, CLOSELY SIMILAR to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

پژمان خدایگان [۱]، حشمت الله رحیمیان [۲]**، مسعود شمس‌بخش [۳]،

ماتیوس اولریخ [۴] و هلگه وینگارت [۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۲۸)

چکیده

بیماری لکه‌زاویه‌ای ختمی خواب‌آلود (*Malvaviscus pendulifloru*) در چند سال متوالی در برخی از مناطق استان‌های مازندران و گلستان مشاهده شده است. لکه‌ها به قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر، نکروزه، قهوه‌ای رنگ، زاویه‌ای شکل و بدون هاله بودند. از برگ‌های بیمار، یک سودوموناس اکسیداز منفی و تولید کننده لوان جداسازی گردید. جدایه‌ها در ویژگی‌های فنوتیپی ، نوع و میزان اسیدهای چرب سلولی و توالی ناحیه ITS شبیه به پاتووار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بودند و بیماری‌زایی آنها با مایه‌زنی به برگ‌های ختمی خواب‌آلود، به اثبات رسید. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *syrB* در همه جدایه‌ها، یک قطعه ۷۲۰ جفت بازی تکثیرگردید. در الگوی انگشت‌نگاری DNA ,rep-PCR، جدایه‌ها از پاتووار *P. s.* pv. *syringae* تفکیک شده و میزان شباهت آنها به جدایه مرجع ۲۸ درصد برآورد شد. نتایج حاصل از بررسی مقدماتی دامنه میزبانی و تعیین توالی برخی از ژن‌های حفاظت شده ژنومی (*gyrB*, *rpoD*) نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلود مشابه با پاتووار *Pss* بوده اما احتمالاً می‌توان آنها را در گروه ژنومی یا پاتووار دیگری قرار داد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس سیرینگی، ختمی خواب‌آلود، تاکسونومی، ایران

---

*: بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارایه شده به گروه بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

۱. دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

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

۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

٤. استاد میکروبیولوژی و دانش زیستی، دانشگاه جاکوب برمن، آلمان

مقدمه

ختمی درختی یا خواب‌آلود (Sleepy mallow or sleeping hibiscus) گیاهی زینتی از خانواده Malvaceae می‌باشد. این گیاه در برابر شرایط نامساعد محیطی نسبتا مقاوم بوده و در بیشتر مناطق آسیا رشد می‌کند و ارتفاع آن به بیش از ۲ متر می‌رسد. از اوایل پاییز گل‌های صورتی تا بنفش رنگی تولید نموده و به‌وسیله قلمه‌های نیمه‌خشبی ساقه تکثیر می‌شود (Bailey 2005). ختمی خواب‌آلود در برخی از مناطق شمالی کشور نیز به صورت پراکنده می‌روید. این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار نبوده و به همین سبب اطلاعات خاصی از بیماری‌های آن در دسترس نیست. از باکتری‌هایی که روی گونه‌های زینتی خانواده مالواسه بیماری‌زا هستند می‌توان به *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas cichorii* pv. *malvacearum* و *P.syringae* اشاره نمود (Chase 1986). این سه باکتری در ختمی‌چینی (*Hibiscus rosa-sinensis*) لکه‌برگی ایجاد می‌کنند ولی گزارشی از بیماری‌زایی آنها روی ختمی خواب‌آلود وجود ندارد. اولین بار در سال ۱۳۶۸ دو نوع علائم مختلف از یک بیماری باکتریایی روی برگ‌های این درخت مشاهده و باکتری عامل لکه‌های قهوه‌ای روشن *P. syringae* تشخیص داده شد (Rahimian 1990). نوع دوم از علائم بیماری بروز لکه‌های زاویه‌ای یا نامنظم، سیاه رنگ و دارای هاله روشن بود که اخیرا براساس ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زائی و ژنوتیپی جدایه‌ای لوان مثبت از گونه *Pseudomonas viridiflava* تشخیص داده شده است (Rouhrazi & Rahimian 2012). گزارش‌های متعددی از وجود پاتووارهای مختلف *P. syringae* در ایران موجود است، که عامل بیماری‌های گوناگونی هستند (Aldaghi *et al*. 2010; Arabi *et al*. 2006; Bahar *et al*., 1985; Banapoor *et al*. 1991 Karimi-Kurdistani & Harighi 2008; Khezri *et al*. 2010; Harighi 2007; Khodaygan *et al*. 2010; Musivand *et al*. 2009; Rahimian 1995). این پاتووارها بر اساس طبقه‌بندی مبتنی بر همولوژی DNA در یکی از ۹ گروه ژنومی *گاردان و همکاران* (Gardan *et al*. 1999, Parkinson *et al*. 2011) قرار دارند. در تعدادی از گزارش‌ها به غیرعادی بودن ویژگی‌های عوامل برخی از بیماری‌های مذکور اشاره شده است. عمده تحقیقات انجام شده به معرفی بیماری از یک منطقه جغرافیایی و یا میزبان‌های خاص و یا مطالعه مقدماتی محدود می‌گردد و اطلاعات جامعی در مورد جایگاه دقیق تاکسونومیکی باکتری، ویژگی‌های میزبانی و صحت تشخیص و نام‌گذاری پاتووارهای گزارش شده و بخصوص جدایه‌هایی که غیر عادی به نظر می‌رسند، وجود ندارد. بررسی‌های قبلی به‌عمل آمده میان جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلود و دیگر بیماری‌گرهای منتسب به پاتووار *P. s*. pv. *syringae* نشان داده است که این گروه از جدایه‌ها، از نظر نقوش پروتئین‌های محلول سلولی و الگوی اثر انگشتی DNA ژنومی متفاوت از جدایه‌های بیماری‌زا در نیشکر و درختان میوه هسته‌دار می‌باشند و از جمله جدایه‌های غیر عادی ایرانی محسوب می‌گردند (Musivand *et al*. 2009). در سه دهه اخیر تلاش گسترده‌ای برای منظم نمودن سیستم تاکسونومی باکتری‌ها به انجام رسیده است. واژه تاکسونومی چندفازی (پلی‌فازی) که در سال ۱۹۷۰ مطرح گردید به تلفیق اطلاعات داده‌های فنوتیپی (آزمون‌های فیزولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای)، شیمیایی، مولکولی، ژنوتیپی و فیلوژنتیکی اشاره دارد تا تعیین جایگاه دقیق تاکسونومیکی یک میکروارگانیسم، امکان‌پذیر باشد (Brenner *et al*. 2005). در این تحقیق تلاش شده است تا با استفاده از روش پلی‌فازی، جایگاه تاکسونومیکی گروهی از جدایه‌های

غیرعادی *Pss* عامل لکه‌زاویه‌ای ختمی خواب آلـود مـورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها

از برگ‌های درختچه‌های ختمی خواب‌آلـود، دارای علائـم لکـه‌برگـی قهـوه‌ای روشـن، در چنـد نوبـت نمونـه‌هـایی جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شد. بخش‌هایی از برگ که دارای لکه بودند پس از شستـشو بـا آب، جدا شده و داخل تـشتک‌هـای اسـتریل حـاوی چنـد قطره آب مقطر خرد گردید. پس از ۳۰ دقیقـه نگـه‌داری در دمای آزمایـشگاه، قطـره‌ای از سوسپانـسیون حاصـله روی محیط کشت آگار غذائی حاوی سـاکاروز (NAS, ۲۳ گـرم Nutrient agar، پنج گرم ساکاروز در یک لیتر آب) مخطط گردیـد. یـک جدایـه مرجـع (IBSEF445)*Pss* کـه از کلکسیون کشت‌های برزیل IBSBF(Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria)، تهیه گردیده بود و یک جدایه اهـدایی آزمایـشگاه بـاکتری شناسی دانشگاه ساری که قبلا جداسازی گردیده بـود نیـز، روی محیط کشت مذکور کشت داده شـد. دو تـا سـه روز پس از کشت و نگه‌داری تـشتک‌هـا در دمـای آزمایـشگاه، پرگنه‌های برجسته و سفید رنگ، به قطر دو تا سه میلی‌متـر در سطح محیط ظـاهر شـد. تـک پرگنـه‌هـای مجـزا بـرای خالص‌سازی و تکثیر روی محیط کشت King`s B مخطط گردید (Schaad *et al*. 2001).

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

آزمـون‌هـای بیوشـیمیایی و فیزیولوژیـک طبـق روش‌هـای متـداول (Fahy & Hayward 1983، Lelliott & Stead, 1987، Schaad *et al.* 2001) انجام شد. طیف منابع کـربن قابل استفاده جدایه‌ها، با استفاده از محیط معدنی پایـه آیـر *آیر و همکاران* (برگرفتـه از Schaad *et al.* 2001) بررسـی شد. قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه بـا روش تنـدال (Tyndall) استریل و به غلظت نهایی ۰/۲ تا یک درصد بـه محیط پایه اضافه شد. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منـابع کربنی بر اساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسـیدیته محـیط کشت نسبت به شاهد (محیط آیر فاقد منبع کربنی) تـا سـه هفته پس از کشت و نگه‌داری تـشتک‌هـا در دمـای ۲۸°C– ۲۵، ارزیابی شد.

آزمون بیماری‌زایی و تعیین دامنه میزبانی

بذر گندم (*Triticum aestivum*)، جو (*Hordeum vulgare*) و لوبیا (*Phaseolous vulgaris*)، در شرایط گلخانه (دمای ۲۸°C–۲۰) در گلدان‌های محتوی خاک شنی–لومی کاشـته و در مرحله ۵ تا ۱۰ برگی، بـرای مایـه‌زنـی بـه کـار بـرده شدند. قلمه نیـشکر(*Saccharum* interspecies hybrid) از مـزارع بهنمیـر و نهـال ختمـی خـواب‌آلـود و هلـو (*Prunus persica*) نیز از دانشگاه کـشاورزی سـاری تهیـه شد. گیاهان ۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی در زیـر کیـسه‌هـای پلاستیکی نگه‌داری شدند. جدایه‌های مـورد بررسـی، روی محیط NAS به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸°C کشت و سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml (براساس میزان کدری سوسپانسیون در طول مـوج ۶۰۰ نـانومتر و رقیـق‌سـازی و کشت رقت‌ها روی محیط NAS و شـمارش پرگنـه) تهیـه شد. سوسپانـسیون بـا محلـول‌پـاش دسـتی روی و پـشت برگ‌های گیاهان پاشیده و متعاقب آن برگ‌ها با فـرو بـردن سنجاق استریل زخم شدند. بخش دیگری از سوسپانـسیون به حدود 10^4 cfu/ml رقیق شده و با کمک سرنگ به پشت برگ‌های گیاهان و سرشاخه نهال هلو در چند نقطه تزریـق شد. به عنوان شاهد از آب مقطـر اسـتریل بـرای تزریـق و

محلول‌پاشی استفاده شد. بعد از مایه‌زنی، بوته‌ها مجددا در زیر پوشش پلاستیکی تا ۴۸ ساعت قرار داده شد و پس از برداشتن پوشش، در گلخانه در دمای ۳۰°C-۲۲ نگه‌داری و برای مشاهده علائم به صورت روزانه ارزیابی شدند (Arabi *et al*. 2006).

بررسی نوع و میزان نسبی اسیدهای چرب سلولی جدایه‌ها

برای بررسی FAME analysis (Fatty acid methyl ester analysis) چهار جدایه باکتری به همراه جدایه *Pss*(IBSEF 445) مرجع، روی محیط Trypticase soy agar، و در دمای ۲۸°C برای ۲۴ ساعت کشت شدند. حدود ۵۰ میلی‌گرم از سلول‌های باکتری بوسیله لوپ پلاتینی به لوله‌های مخصوص با درپوش تفلونی منتقل شد. اسیدهای چرب سلولی به روش ستید (Stead 1992) استخراج گردید. نیم میکرولیتر از اسیدهای چرب محلول شده به دستگاه gas chromatograph (GC) (Hewlett-Packard 5890)، مجهز به ستون fused capillary silica و ردیاب flame ionization تزریق گردید. دمای انژکتور ۲۵۰°C بود و دمای ستون روی ۱۷۰°C تنظیم شد و با افزایش پنج درجه‌ای در هر دقیقه، به ۲۷۰°C رسید. اطلاعات به‌دست آمده از دستگاه GC مستقیما به رایانه منتقل شد و به‌وسیله نرم‌افزار Microbial Identification System Software (MIDI lab, USA) تجزیه و تحلیل گردید (Stead 1992).

استخراج DNA

جدایه‌ها در محیط NA کشت شدند. پس از دو روز رشد در دمای ۲۸°C–۲۵، سلول‌ها در آب مقطر سوسپانسیون شدند. کدری (OD) سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲–۰/۱ واحد تنظیم شد. به هر نمونه ۰/۱ حجم هیدروکسید پتاسیم یک نرمال اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک دقیقه جوشانده شدند. محلول شفاف (Lysed) حاصله به صورت مستقیم به‌عنوان DNA الگو در آزمون‌های ژنوتیپی استفاده گردید (Arabi *et al*. 2006). برای تعیین غلظت DNA، دو میکرولیتر از اسیدنوکلئیک استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید. بررسی غلظت DNA کل استخراج شده با مقایسه شدت نوار حاصله در مقایسه با مقدار مشخصی از DNA فاژ لامبدا صورت گرفت (Ausubel *et al*. 1992).

انگشت نگاری ژنتیکی

مقایسه الگوی اثر انگشتی اسیدنوکلئیک جدایه‌ها با روش rep-PCR(repetitive extragenic palindromic) طبق برنامه توصیه شده و با اندکی تغییر و با استفاده از آغازگرهای ERIC-PCR و BOXA1R-PCR (آغازگرها به‌وسیله شرکت MWG آلمان ساخته شدند) انجام شد (Versalovic *et al.* 1991, Weingart & Volksch 1997).

شرایط انجام الکتروفورز

الکتروفورز محصولات حاصل از PCR، در ژل آگاروز یک درصد به همراه یک نشانگر وزنی (۱ Kb، ساخت شرکت Fermentas) و در بافر تریس-بوریک اسید، EDTA (TBE، ۸۹ میلی‌مولار تریس، ۸۹ میلی‌مولار اسید بوریک، دو میلی‌مولار EDTA، pH ~ ۸/۲) انجام شد. نمونه‌ها (پنج میکرولیتر) پس از اختلاط با یک میکرولیتر رنگ آماده (6X loading dye) در چاهک‌های ژل ریخته شده و الکتروفورز در اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت، تا رسیدن برم‌فنل‌بلو به انتهای ژل انجام شد. ژل با اتیدیوم بروماید (محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و از آن عکس‌برداری شد (Ausuble *et al*. 1992).

تعیین شباهت و گروه‌بندی جدایه‌ها

شباهت جدایه‌ها با مقایسه نقوش قطعات DNA در ژل، وجود و عدم وجود قطعات همسان در دو جدایه (نمره‌دهی صفر و یک) و محاسبه ضریب تشابه جاکارد (Jaccords coefficient) صورت گرفت. ماتریس تشابه تشکیل و دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی‌وزن UPGMA (unweighted pair group Method with arithmetic averages,) با نرم‌افزار MVSP 3.13 و NTSYS 2.02 محاسبه و ترسیم گردید (Stenstrom *et al*. 1990).

بررسی حضور ژن مولد سرینگومایسین در جدایه‌ها

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهای معرفی شده B2 و B1 انجام شد و محصول آن در ژل آگاروزی ۱ درصد بارگذاری شد (Sorensen *et al.* 1998).

تکثیر برخی ژن‌ها و مناطق نیمه حفاظت شده ژنوم جدایه‌ها

ژن *gyrB*، *rpoD* و ناحیه بین ژنی اسیدهای نوکلئیک ریبوزومی (intergenic transcribed spacer, ITS) 16S–23S rRNA تکثیر گردید. محصول واکنش در ژل آگاروزی ۱/۵ درصدی بارگذاری گردید (Manceau & Horvais 1997; Yamamoto & Harayama 1995; Mulet *et al*. 2008).

همسانه‌سازی و تعیین توالی قطعات

قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت Nucleospin Extract II (ساخت شرکت Macherey-Nagel آلمان) و براساس روش توصیه شده، از ژل جدا و خالص‌سازی گردیدند. جهت تهیه همسانه‌ها از ناقل pGEM easy vector مطابق توصیه شرکت سازنده (Promega, USA)، استفاده گردید. قطعات خالص شده پس از الحاق در ناقل *E.coli* DH5α، همسانه‌سازی شد. پلاسمید پرگنه‌های نوترکیب، با استفاده از کیت Nucleospin Extract II استخراج و برای تعیین توالی به شرکت MWG ارسال شد. تعیین توالی با روش Di-deoxy با دستگاه‌های ABI و در هر دو جهت (سنس و آنتی‌سنس) و با استفاده از آغازگرهای استاندارد Sp6 و T7، انجام گرفت. هر قطعه یک بار در هر دو جهت و یک بار دیگر در جهت سنس تعیین توالی گردید.

آنالیز رایانه‌ای و آماری توالی‌ها

توالی‌های به‌دست آمده، ابتدا با استفاده از برنامه Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) اصلاح شده و سپس با استفاده از برنامه BLAST(NCBI) با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن همردیف گردید (Altschul 1990). بررسی مقایسه‌ای با همردیف سازی چندگانه (Multiple sequence alignment) با استفاده از برنامه ClustalW انجام شد (Thompson *et al*. 1994). فاصله ژنتیکی توالی جدایه‌های مختلف و ارتباط فیلوژنتیکی آنها با یکدیگر و هم‌چنین با تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از برنامه MegAlign Ver. 5.00 در مجموعه DNASTAR package (DNASTAR Inc.) و هم‌چنین برنامه MEGA4. بررسی گردید (Kumar *et al*. 2004).

نتایج

جداسازی

از کشت نمونه‌های ختمی خواب‌آلود که دارای علائم لکه‌برگی قهوه‌ای روشن بودند، جدایه‌هایی با پرگنه‌های محدب سفید رنگ و لعابدار روی محیط NAS به دست

آمد. قطر پرگنه‌ها بعد از دو روز در دمای 25^0C حدود دو میلی‌متر و بعد از سه روز حدود سه میلی‌متر و با حاشیه صاف بود. چهل جدایه از نمونه‌های ختمی با پرگنه‌های هم شکل که در محیط King`s B رنگدانه فلورسانت تولید کردند، انتخاب و بررسی شدند. کلیه جدایه‌ها، گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک، هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند و هیچ کدام قادر به تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و استفاده از ال-تارتارات نبودند. جدایه‌ها لوان تولید کرده، آربوتین و ژلاتین را هیدرولیز نموده و در برگ‌های توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد کردند. بر مبنای این ویژگی‌ها و نیز ویژگی‌های فهرست شده در جدول ۱، جدایه‌ها به عنوان *P. syringae* شناسایی شدند.

بیماری‌زایی و دامنه میزبانی

هفت روز پس از مایه‌زنی، با هر دو روش محلول‌پاشی و تزریق سوسپانسیون به برگ، در پهنک برگ‌ها لکه‌های نکروزه روشن ظاهر شد. لکه‌ها آبسوخته بوده و گسترش آرامی داشتند (شکل ۱). در همه موارد علایم ایجاد شده پس از مایه‌زنی مصنوعی، مشابه با علایم مشاهده شده در شرایط طبیعی بود. در گیاهان شاهد که تنها با آب مایه‌زنی شده بودند، علایمی ظاهر نگردید. باکتری‌ها، دوباره از گیاهان مایه‌زنی و آلوده شده، روی محیط King`s B، جداسازی گردید. گندم، جو و لوبیا نیز پس از مایه‌زنی با جدایه‌های به‌دست آمده از ختمی، حساسیت نشان دادند. این جدایه‌ها توانایی آلوده‌سازی نیشکر و هلو را نداشتند.

ردیابی حضور ژن مولد سرینگومایسین در جدایه‌ها

ژن *syrB* که کدکننده زیر واحد ۱۲۰۰ دالتونی از زهرابه سرینگومایسین است در همه جدایه‌های بیماری‌زا و *Pss* مرجع تکثیر شد. اندازه قطعه تکثیر شده پس از آشکارسازی در ژل اگاروز ۷۲۰ جفت باز ارزیابی گردید (شکل ۴).

اسیدهای چرب جدایه‌ها

نوع و میزان نسبی اسیدهای چرب جدایه مرجع *Pss*(IBSEF445) و چهار جدایه به عنوان نماینده جدایه‌های به‌دست آمده از ختمی با کروماتوگرافی گازی و به روش FAME analysis تعیین شد. شباهت زیادی میان جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلود، با جدایه مرجع پاتووار *Pss* مشاهده شد. در همه جدایه‌ها اسیدهای چرب ۱۶ کربنه غالب بودند (جدول ۳).

انگشت‌نگاری ژنتیکی

در الگوی اثر انگشتی BOX-PCR (شکل ۲) جدایه‌های بیماری‌زا در سطح تشابه ۷۸ درصد گروه همگنی را تشکیل داده و میزان شباهت آنها به پاتووار مرجع *Pss*, ۲۷ درصد بود. در ERIC-PCR جدایه‌ها ۶۹ درصد به یکدیگر شبیه بوده و در سطح تشابه ۳۰ درصد از پاتووار مرجع متمایز شدند. ضریب کوفتیکی بین ماتریس تشابه و دندروگرام r =۰/۸۲ به‌دست آمد که نشان‌دهنده هم‌بستگی مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه است. تلفیق داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS و رسم دندروگرام حاصل از آن نشان داد که می‌توان در سطح تشابه ۲۹ درصد جدایه‌ها را از پاتووار *Pss* تفکیک نمود (شکل۳).

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها براساس توالی نواحی نیمه حفاظت شده ژنوم

درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌یابی قطعه ITS نشان داد که نماینده جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلود در کنار اعضا گروه ژنومی یک قرار دارد (شکل ۶). نتایج

جدول ۱. خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیائی و تغذیه‌ای باکتری‌های جدا شده از ختمی خواب‌آلود در مقایسه با پاتووار *Pss* IBSEF445

Table 1. Morphological, biochemical and physiological characteristics of the bacterial strains isolated from sleepy mallow compared with those of *Pss* IBSEF445

واکنش جدایه مرجع Reaction of a reference strain of *Pss* (IBSEF451)	واکنش جدایه‌های ختمی خواب‌آلود Reaction of sleepy mallow bacterial strains	Characteristic	ویژگی
		Hydrolysis of:	یدرولیز:
+	+	Esculin, Casein, Gelatin, Arbutin	اسکولین، کازئین، ژلاتین، آربوتین
+	80	Tween-80	توئین ۸۰
+	45	Tyrosin	تایروزین
+	+	Starch	نشاسته
+	+	Gelatin	ژلاتین
+	+	Arabutin	آربوتین
-	-	Starch	نشاسته
-	-	Lecithinase, Oxidase, Arginine dihydrolase	لستیناز، اکسیداز، هیدرولیز آرژنین
+	+	Catalase	کاتالاز
+	+	Growth on 5% NaCl	رشد در محیط حاوی ۵٪ نمک طعام
-	-	Growth on 7% NaCl	رشد در محیط حاوی ۷٪ نمک طعام
-	-	Nitraet reduction, Urease, Production of Indole	احیا نیترات، اورآز، تولید اندول،
+	+	Levan formation	تولید لوان
+	+	H_2S production from cyctein	تولید H_2S از سیستئین
+	+	Tobacco hypersensitivity, Phosphatase activity	فوق حساسیت در توتون، فسفاتاز
-	-	Production of indole	تولید اندول
-	-	Potato rot	لهانیدن سیب زمینی
+	+	Reducing substances from sucrose	تواید مواد احیا کننده از سوکروز
+	+	Production of syringomycin	تولید سرینگومایسین
		Acid production from	تولید اسید از:
+	+	Galactose, Sucrose	گالاکتوز، سوکروز
–	–	Ethanol	اتانول
+	+	D-Arabitol	د- آرابیتول
+	+	L-Alanin	ال- آلانین
+	+	D-Mannitol	د- مانیتول

ادامه جدول ۱.

Table 1 continued

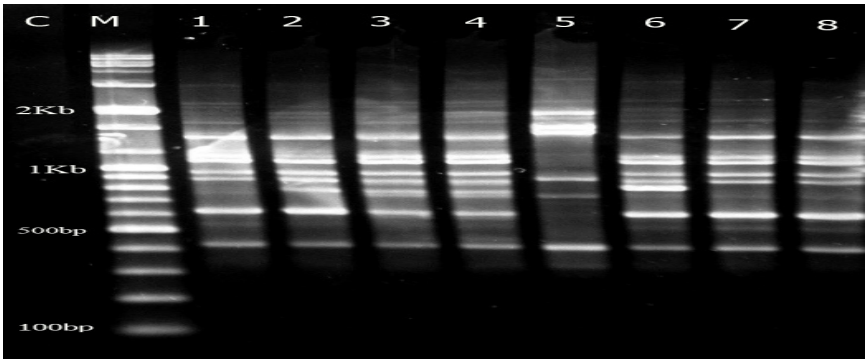
واکنش جدایه مرجع Reaction of a reference strain of *Pss* (IBSEF445)	واکنش جدایه‌های ختمی خواب‌آلود Reaction of sleepy mallow bacterial strains	Characteristic	ویژگی
	+	Glycerol, Glucose	گلیسرول، گلوکز
–	3	D-Terhalose	د–ترهالوز
+	+	D-Sorbitol	د–سوربیتول
+	+	Arabinose	آرابینوز
+	19	mayo-Inositol	مایواینوزیتول
+	70	Melibiose	ملی‌بیوز
+	+	Fructose	فروکتوز
+	+	meso-Erythritol	مزواریتریتول
–	15	Adonitol,	آدونیتول
-	-	D-Lactose, Dulcitol	د– لاکتوز، دولسیتول
-	-	Rhamnose	رامنوز
-	-	Maltose	مالتوز
-	19	Raffinose	رافینوز
		Utilization of	استفاده از:
+	+	Citrate, Succinate, Malonate, Lactate	سیترات، سوکسینات، مالونات، لاکتات
-	-	Oxalate, Benzoate, Glycine, Salicin, Dextrin, L-Tartarate	اگزالات، بنزوات، سالیسین، گلایسین، دکسترین، ال– تارتارات

– = همه جدایه‌ها پاسخ منفی داده‌اند. + = همه جدایه‌ها پاسخ مثبت داده‌اند. [a]= (درصد جدایه‌هائی که واکنش مثبت داشته اند).

- = negative results with all strains. + = positive results with all strains. [a] = percentage of strains with positive reaction.

شکل ۱. لکه زاویه‌ای ایجاد شده در برگ ختمی خواب‌آلود یک هفته پس از مایه‌زنی با جدایه شماره ۱

Fig. 1. Angular leaf spots appearing on sleepy mallow leaves 7 days after inoculation with strain number 1



شکل ۲. نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA نمایندگانی از جدایه‌های ختمی خواب‌آلود بـا BOX- PCR (سـتون‌هـای ۱ تـا ۸) سـتون ۵ *Pss*. C کنترل منفی و M نشانگر جرم مولکولی ۱۰۰ جفت بازی است.

Fig. 2. BOX– PCR fingerprint of bacterial strains isolated from sleepy mallow (lanes 1-8) and those of *Pss* (lane-5) . C: water for DNA template (Negative control). M: 100-bp DNA ladder.

جدول ۲. نوع و درصد اسیدهای چرب موجود در جدایه‌های به‌دست آمده از ختمی خواب‌آلود و جدایه مرجع

Table 2. Fatty acid profiles of sleepy mallow isolates and reference strain

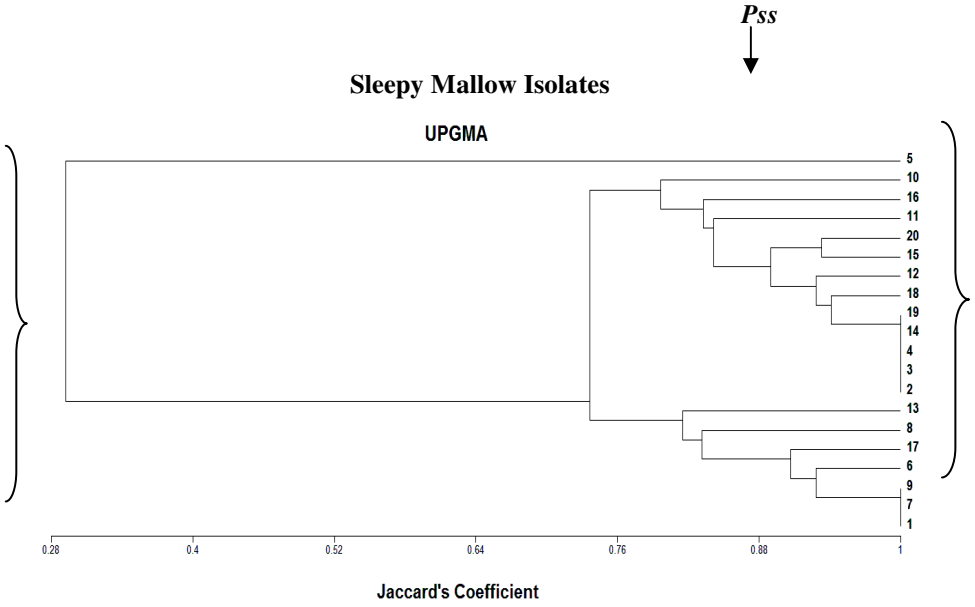
نوع اسید چرب Fatty acid	درصد اسیدهای چرب Percentage of fatty acids	
	Pss	ختمی خواب آلود Sleepy Mallow
10:0 3-OH	2.6	2.5
12:0	4.5	4.6
12:0 2-OH	2.8	2.8
12:0 3-OH	4.4	4.4
14:0	0.2	0.22
14:0 iso	0.21	0.2
15:0	0.7	0.5
16:0	27.1	27.7
17:0 iso	0.2	0.2
17:0 cyclo	0.28	0.3
18:0	1.4	1
18:1 w6c	1	1

Pss: P. s. pv. syringae (IBSEF445)

توالی‌یابی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* تصویر متفاوتی از ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها ارائه نمود. تعـدادی از اعـضای گـروه ژنـومی دو بـه دو خوشـه جداگانـه تقـسیم‌بنـدی شـدند. جدایه‌های بیماری‌زای ختمـی خـواب‌آلـود در یکـی از دو خوشه مذکور قرار گرفتند (شکل ۵).

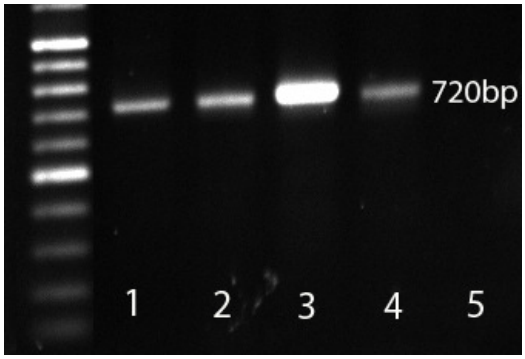
بحث

علائم بیماری لکه‌برگی ختمی خواب‌آلود بـیش از دو دهـه در دو اسـتان مازنـدران و گلـستان مـشاهده شـده و در بررسی‌های مقدماتی عامل آن *Pss* نام‌گذاری گردیده اسـت (Rahimian 1990). درختان ختمی خـواب‌آلـود در ایـران علاوه بر جدایه‌های منتسب به *Pss* مورد تهـاجم برخـی از



شکل ۳. دندروگرام ترکیبی الگوی اثر انگشتی جدایه‌های به دست آمده از ختمی خواب‌آلود با استفاده از روش rep-PCR. شماره‌های ۱ تا ۲۰ جدایه‌های ختمی و شماره ۵ جداهٔ مرجع Pss است.

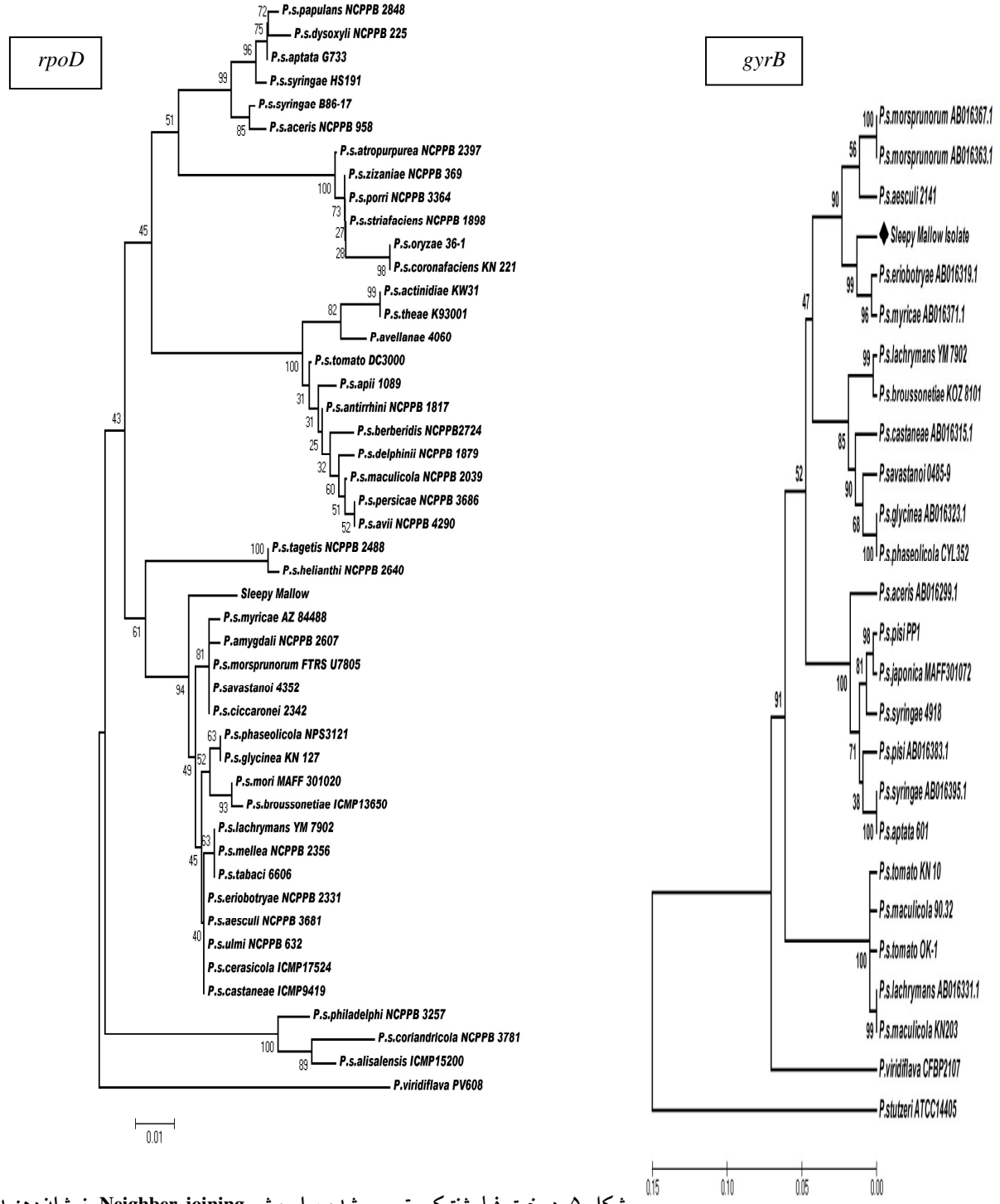
Fig.3. Dendrogram obtained by comparison of strains isolated from sleepy mallow (number 1 to 20) and *Pss* (number 5) using rep-PCR.



شکل ۴. قطعه ۷۲۰ بازی تکثیر شده از ژن مولد سرینگومایسین در ژل اگاروزی ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. .شماره‌های ۱، ۲ و ۳ جدایه‌های ختمی، شماره ۴ جدایه *Pss* می‌باشد. شماره ۵ کنترل منفی و M نشانگر جرم مولکولی است.

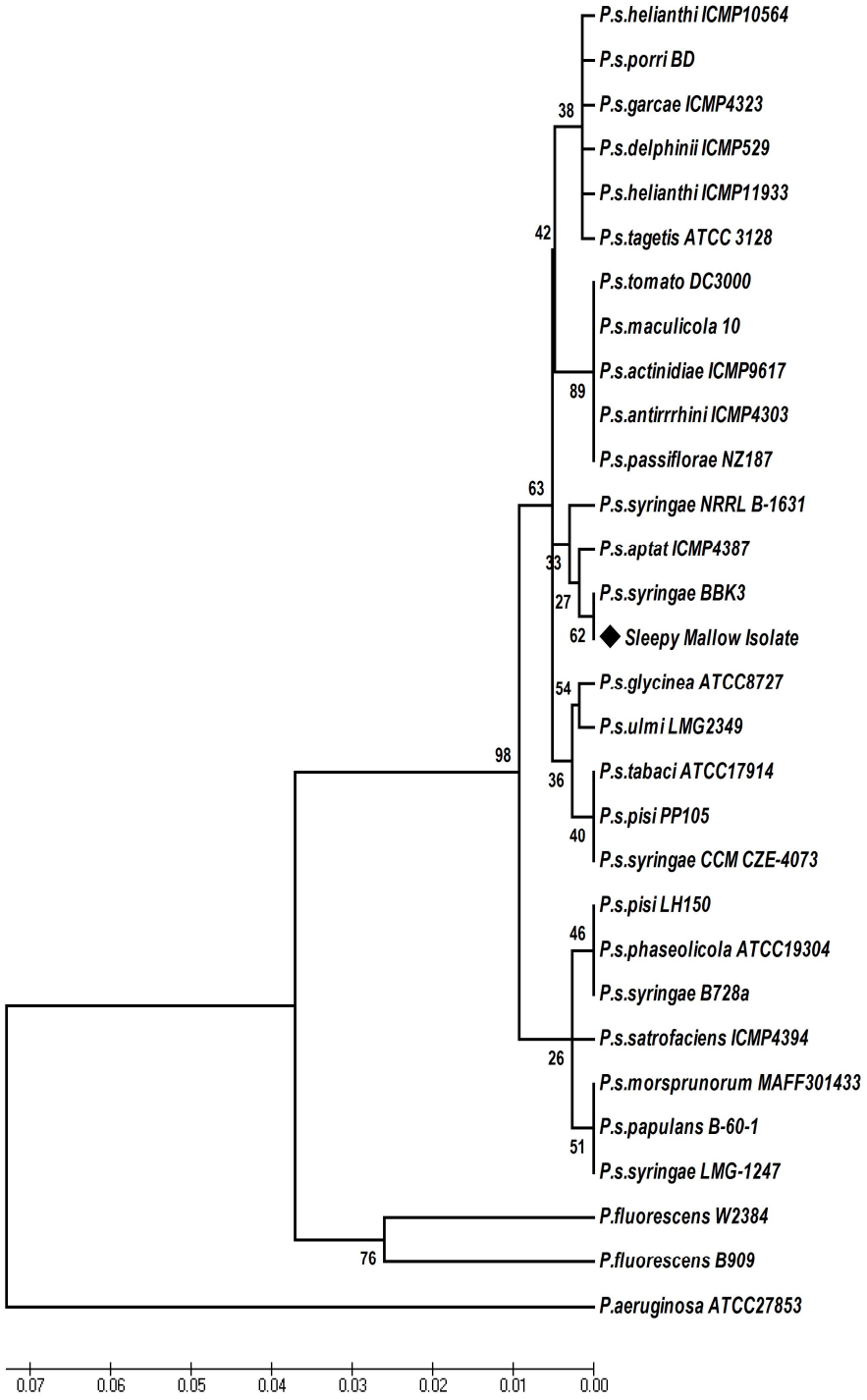
Fig.4. The 720 bp fragment from the syrB gene in 1 % agarose gel stained with etidium bromide. sleepy mallow isolates (Lane 1 to 3). *Pss* (lane 4). 5: water for DNA template (negative control). M: 1500-bp DNA ladder.

جدایه‌های لوان مثبت *P. viridiflava* نیز قرار می‌گیرند (Rouhrazi & Rahimian 2012). علائم ایجاد شده توسط این دو گروه از باکتری‌های بیماری‌زا تا اندازه‌ای مشابه بوده، اما با توجه به تفاوت در رنگ لکه‌برگی ایجاد شده، قابل تفکیک می‌باشد. لکه‌برگی‌های ناشی از جدایه‌های منتسب به *Pss* قهوه‌ای روشن بوده و معمولا فاقد هاله مشخصی می‌باشند، حال آنکه جدایه‌های *P. viridiflava* لکه‌هایی در برگ ایجاد می‌نماید که تیره رنگ و دارای هاله است. در بررسی حاضر گیاهانی که دارای علائم لکه‌برگی قهوه‌ای روشن بودند و در دو سال نمونه‌برداری به صورت



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighber joining، نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلود در مقایسه با تعدادی از پاتووارهای مهم *Pseudomonas syringae* . درخت‌ها بر اساس: توالی ژن *rpoD* و توالی ژن *gyrB* و با اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم شده‌اند

Fig. 5. Neighbor-joining trees based on sequences of representatives of the studied isolates from sleepy mallow and some type strains of related *Pseudomonas syringae* pathovars. Trees were drawn based on sequences of *rpoD* and *gyrB* gene with 1000 bootstrap.



شکل ۶. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighbor joining، نشان دهنده ارتباط ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی خواب‌آلـود در مقایسه با تعدادی از پاتووارهای مهم *Pseudomonas syringae* . درخت بر اساس: تـوالی ناحیـه ITS و بـا اعتبارسـنجی ۱۰۰۰ ترسیم شده‌اند

Fig. 6. Neighbor-joining tree based on sequences of representatives of the isolates from sleepy mallow and some type strains of *Pseudomonas syringae* pathovars. Tree was drawn based on sequences of ITS region with 1000 bootstrap.

فراگیر در هر دو استان به آنها برخورد شد، مورد مطالعه قرار گرفتند. به نظر می‌رسد بروز هر یک از این دو نوع علائم، به شرایط آب و هوایی ویژه‌ای وابستگی دارد که چگونگی آن مشخص نیست. با توجه به نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پژوهش حاضر، این گروه از باکتری‌ها متعلق به گونه *P. syringae* (Palleroni *et al.* 1973; Schaad *et al.*2001) هستند. براساس طیف منابع کربنی مورد استفاده، باکتری جداسازی شده مشابه با پاتووار *Pss* (Young & Triggs 1994; Schaad *et al.* 2001; Bradbury, 1986) بودند. این جدایه‌ها با وجود اختلاف در میزبان و منطقه جغرافیایی متفاوت، از نظر ویژگی‌های فنوتیپی تفاوتی با جدایه مرجع نداشتند. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی برای تشخیص این گروه ضروری است اما برای تعیین جایگاه دقیق تاکسونومی آنها کافی نمی‌باشد. این نکته تاییدی بر پیچیدگی زیادی است که در تاکسونومی پاتووارهای این گونه و بخصوص پاتووار *Pss* وجود دارد (Hildebrand *et al.* 1982; Roos & Hattingh 1987). الگوی اسیدهای چرب سلولی جدایه‌ها، انطباق بالایی با ویژگی‌های فنوتیپی آنها داشت. بر این اساس می‌توان جدایه‌های بیماری‌زا را به گروه ژنومی یک گاردان (Gardan *et al.* 1999) متعلق دانست و آنها را در کنار پاتووار *Pss* قرار داد. استفاده از پروفیل اسیدهای چرب در طبقه‌بندی و تشخیص سریع سودومونادهای بیماری‌زای گیاهی همواره مورد توجه بوده است (Weller *et al.* 2000; Oyaizu &Komagata 1983; Stead 1988). احتمالاً این روش نیز مانند ردیابی ژن‌های دخیل در تولید زهرابه، برای شناسایی سریع و کم‌هزینه این گونه مناسب است، اما برای تفکیک جدایه‌ها و پاتووارهایی که بسیار به هم شبیه هستند، کارآیی ندارد. انگشت‌نگاری ژنتیکی با استفاده از rep-PCR به عنوان ابزاری مفید در شناسایی و تعیین روابط تاکسونومیکی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله پاتووارهای *P. syringae* مطرح است (Vincente & Steven 2007; Louws *et al.* 1994; Rademaker *et al.* 1998; Weingart & Volksch 1997). اطلاعات به‌دست‌آمده از انگشت‌نگاری با استفاده از این نشانگرها و بخصوص BOX-PCR منجر به تفکیک گروه‌های غیرعادی از یکدیگر شده است که عموماً بر اساس اطلاعات فنوتیپی و الگوی اسیدهای چرب غیرقابل تمایز بوده‌اند (Koike *et al.* 1999; Louws *et al.*1994; Zhao *et al.*2000; Weingart & Volksch 1997). به نظر می‌رسد ترکیبی از اطلاعات به‌دست‌آمده از نشانگر rep-PCR، روش‌های فنوتیپی، پروفیل اسیدهای چرب و دامنه میزبانی، تصویری نسبتا واضح از موقعیت متمایز این گروه از جدایه‌های بیماری‌زا در ختمی، فراهم می‌آورد. جدایه‌های بیماری‌زا نه تنها الگوی اثر انگشتی متفاوتی از جدایه مرجع *Pss* داشته بلکه از نظر دامنه میزبانی نیز متفاوت بودند. بدین جهت تعیین قطعی موقعیت تاکسونومیکی آنها نیازمند انجام بررسی‌های دقیق‌تر ژنوتیپی بود. به دلیل وجود تفاوت در طول و توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS، مطالعات متعددی به منظور شناسایی و تعیین روابط اجدادی سودومونادهای بیماری‌زای گیاهی انجام شده‌است. در این تحقیق اطلاعات حاصل از توالی‌یابی ناحیه ITS با یافته‌های فنوتیپی همخوانی داشت و بر این اساس جدایه‌های بیماری‌زا در کنار پاتووار *Pss* قرار می‌گیرند. در برخی از بررسی‌های مشاهده شده است که تفاوت بسیار اندکی در توالی ناحیه ITS میان دو پاتووار *P. s.* pv. *tomato* و *P. s.* pv. *tagetis* وجود دارد، درحالی‌که این دو پاتووار به دو گونه ژنومی مجزا تعلق دارند(Manceau & Horvais 1997; Kong *et al.* 2005).

جدول ۳. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده و اندازه قطعات مورد انتظار

Table 3. Primer names, sequences and size of expected bands

آغازگر Primer	توالی Sequence	اندازه قطعه Size of Band	دمای اتصال Annealing Temperature
ITS	D21- AGCCGTAGGGGAACCTGCGG D22- TGACTGCCAAGGCATCCACC	690bp	60°C
ERIC	ERICl-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC' ERIC2-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	45°C
BOX	BOXAlR -CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-	-	50°C
syrB	B1- CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG B2- TCGATTTTGCCGTAATGAGTC	720bp	60°C
rpoD	PsEG30F- ATYGAAATCGCCAARCG PsEG790R- CGGTTGATKTCCTTGA	750bp	52°C
gyrB	UP-1- GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA UP-2r- AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT	1200bp	60°C

احتمالاً استفاده از این ناحیه برای مطالعات تکاملی گاهی به نتایج غیر واقعی منجر می‌گردد. دو گونه خواهری *P. s.* pv. *phaseolicola* و *P. s.* pv. *glycinea* که در ویژگی‌های مختلف شباهتی بالا دارند با استفاده از توالی این ناحیه در دو خوشه جداگانه قرار گرفتند. جدایه‌های گروه *Pss* نیز در خوشه‌های مختلف تقسیم شده‌اند. بنابراین اختلافات کوچک در توالی این ناحیه که می‌تواند ناشی از خطای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و یا خطای تعیین توالی باشد، سبب تغییر موقعیت یک گونه از یک خوشه به خوشه دیگر می‌شود. این نکته و هم‌چنین پایین بودن اعتبار دسته‌بندی در برخی خوشه‌ها، که سبب کاهش ارزش خطوط تکاملی ترسیم شده است، استفاده از این توالی را برای مطالعه دقیق روابط فیلوژنتیکی در میان پاتووارهای این گونه، بخصوص جدایه‌های پاتووار *Pss* با تردید همراه نموده است. مشخص گردیده است که ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی مانند *gyrB*، *rpoD* و *rpoB* توان بیشتری در انعکاس رابطه فیلوژنتیک بین گونه‌ها را، دارند (Mulet *et al*. 2008). این ژن‌ها با نرخ سریع‌تری نسبت به اپران ریبوزومی تکامل یافته اما این نرخ نسبت به سایر قسمت‌های ژنوم بسیار کمتر است (Case *et al*. 2007; Mulet *et al*. 2008; Tayeb *et al*. 2005). براساس توالی ژن *gyrB* و *rpoD* جدایه‌های ختمی خواب‌آلود احتمالاً به گروه ژنومی دو گاردان (Gardan *et al*.1999) تعلق دارند. این اطلاعات با یافته‌های دیگران (Sawada *et al*. 1999) مطابقت دارد. بررسی قرابت ۵۶ استرین از ۱۹ پاتووار با استفاده از توالی ژن *gyrB* منجر به توصیف سه گروه مونوفیلتیک شد. نتایج نشان داد که در گروه یک، تعدادی از اعضای گونه ژنومی یک، دو و سه در یک خوشه قرار دارند (Sawada *et al*.1999). در یکی از مطالعات اخیر نشان داده شده است که توالی ژن *rpoD* گزینه‌ای مناسب برای بررسی ارتباطات فیلوژنتیکی میان پاتووارهای مختلف این گونه است و اطلاعات حاصل تطابق بالایی با نتایج دورگه‌سازی DNA دارد (Parkinson *et al*. 2011). بر این اساس احتمالاً جدایه‌های ختمی نیز گروهی جداگانه هستند که از نظر تکاملی به اعضای گونه ژنومی دو وابسته

بوده و یا عضوی از این گونه محسوب می‌شوند که این نتایج با بررسی مقدماتی رحیمیان (Rahimian 1990) همخوانی ندارد. با عنایت به تعریف پاتووار و بخصوص با توجه به اطلاعات حاصل از تعیین توالی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* ، تفاوت در دامنه میزبانی و الگوی اثر انگشت ژنومی، می‌توان این جدایه‌ها را مشابه با پاتووار *Pss* معرفی نمود. به نظر می‌رسد برای درک بهتر روابط اجدادی و موقعیت دقیق تاکسونومیکی این جدایه‌ها نیاز به بررسی میزان همولوژی DNA و بررسی‌های ژنوتیپی بیشتری است. تا کامل شدن اطلاعات در این زمینه و یا تعیین میزان همولوژی DNA، می‌توان این جدایه‌ها را به عنوان یک پاتووار توصیف نشده *P. syringae* یا مشابه با پاتووار *Pss* معرفی نمود و آنها در کنار *P. viridiflava* به عنوان دومین عامل ایجاد لکه‌برگی در درختچه‌های ختمی خواب‌آلود ایران معرفی نمود. بررسی تعامل این دو باکتری، شرایط ظهور (به‌ندرت) هم‌زمان و نقش احتمالی هر یک در تشدید یا تخفیف بیماری نیز، موضوعی قابل تامل می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (5-1) متن انگلیسی مراجعه شود.