

بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی اروینیا‌های پکتولیتیک جدا شده از میزبان‌های زینتی در بخش‌هایی از شمال ایران*

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIVERSITY OF PECTOLYTIC ERWINIAS ISOLATED FROM ORNAMENTAL HOSTS IN SOME NORTHERN PARTS OF IRAN

ساره بقائی راوری^۱، مسعود شمس بخش^{۱*}، حشمت ا... رحیمیان^۲ و ناصر صفائی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۶/۲۴)

چکیده

طیف وسیعی از باکتری‌های پکتولیتیک سبب خسارت به گیاهان زینتی می‌شوند. شناسایی دقیق عامل بیماری و بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌ها، برای اعمال روش‌های کنترل مؤثر، ضروری است. تعداد ۳۸ جدایه باکتری از برگ و قسمت‌های گوشتی گیاهان زینتی از گلخانه‌های مختلف استان‌های گیلان، گلستان، شرق مازندران و شهر مشهد جداسازی شد. جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی و انگشت نگاری DNA ژنومی مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی افتراقی، جدایه‌ها در جنس‌های *Dickeya Pectobacterium* و بینابین آنها قرار گرفتند. در آنالیز عددی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی افتراقی، جدایه‌های متناسب به جنس‌های بالا در ۱۲ گروه دسته‌بندی شدند. جدایه‌های گیاهان زینتی در الگوی پروتئین‌های سلولی متنوع بودند. این روش در دسته‌بندی مقدماتی جدایه‌ها مفید بود. با به کارگیری آغازگرهای ERIC، REP، BOX، قطعات DNA ژنومی جدایه‌های نماینده به همراه ۱۱ جدایه استاندارد تکثیر و الکتروفورز گردید. بر اساس الگوی به دست آمده از هر سه آغازگر، جدایه‌های گیاهان زینتی با اختلاف زیادی در کنار استانداردها گروه‌بندی شدند. به نظر می‌رسد rep-PCR در گروه‌بندی جدایه‌های اروینیا پکتولیتیک از قابلیت کافی برخوردار نیست.

واژه‌های کلیدی: لکه برگ، پوسیدگی نرم، گیاهان زینتی، rep-PCR

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

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

۱. به ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

مقدمه

حالت چسبناک دارد که با تهیه یک اسلاید میکروسکوپی به وضوح تراوش جمعیت سلول‌های باکتری (ooze) قابل دیدن است. عوامل پوسیدگی نرم و لکه برگی از گیاهان زیتنی متعددی چون آگلونما (McFadden 1969; Arias et al. 1998; Chao et al. 2006)، دیفن باخیا (MacFadden 1961; Nieves-Brun et al. 1985)، فیلودندرون (Knauss & Miller 1974)، بگونیا (Boyras et al. 2005)، لاله (Saaltink & Kamerman 2005)، سینگونوم (Knauss & Wehlburg 1969; Alippi et al. 2006) و لاله (Lopez 2009) جدا شده است. در ایتالیا بر اساس مشخصات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، پوسیدگی نرم ساقه فلفل‌های گلخانه‌ای را (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) شناسایی نمودند (Fiori & Schiaffino 2004). هم‌چنین کیم و همکاران در سال ۲۰۰۷، با به کارگیری آزمون‌های بیوشیمیایی و آنالیز اسید چرب زیر گونه *Pcc* را به عنوان عامل پوسیدگی کاکتوس‌های پیوندی (*Chamecereus silvestrii*) در کره معرفی نمودند (Kim et al. 2007).

سه گروه از توالی‌های حفاظت شده تکراری ERIC، REP و BOX به طور مجزا در موقعیت‌های بین ژنی ژنوم باکتری‌ها قرار گرفته‌اند (De Bruijn 1992) و نقش مهمی در سازماندهی ژنوم باکتریایی ایفا می‌کنند (Louws et al. 1994). نقش این عناصر حفظ شده تکراری در فعالیت‌های سلولی به طور دقیق مشخص نیست. احتمالاً آنها در پایداری mRNA، ترجمه، نوترکیبی همولوگ، سازماندهی کروموزم و اتصال به هیستون، DNA ژیراز، DNA پلیمرز I تأثیرگذار می‌باشند (Versalovic et al. 1991, De Bruijn 1992). وجود واحدهای تکراری بین ژنی ERIC فقط در ژنوم

باکتری‌های پکتولیتیک عامل لکه برگی و پوسیدگی نرم گیاهان زیتنی روی طیف وسیعی از میزبان‌های گلخانه‌ای خسارت‌زا می‌باشند. با توجه به این که دامنه میزبانی اروینیا‌های پکتولیتیک به طور دقیق مشخص نیست، شناسایی نوع بیمارگر برای مدیریت کنترل بیماری حائز اهمیت زیادی است (Toth et al. 2001). در ایران حجارود (Hedjarood 1967) و متعاقب آن امانی (Amani 1969) پوسیدگی نرم غده سیکلامن را بررسی و عامل بیماری را گونه‌ای از پکتوباکتریوم معرفی نمودند. از آن به بعد گزارش‌هایی مبنی بر جداسازی عوامل لکه برگی و پوسیدگی نرم از گیاهان دیفن باخیا (Arab & Rahimian 1989, Hasanzadeh 1995)، زنبق (Rahimian & Talei 1995)، فیلودندرون (Taghinasab et al. 2006a)، دیفن باخیا (Razi Nataj et al. 2008a)، آگلونما (Khademlou et al. 2006, Razi Nataj et al. 2008b)، پاندانوس (Taghinasab et al. 2006b)، لاله واژگون (Mahmoodi et al. 2006)، کاکتوس، گلیول و دراسنا (Taghinasab et al. 2008) ارائه شده است.

علائم روی برگ‌های گیاهان زیتنی به صورت لکه‌های آسوخته و نامنظم همراه با هاله زرد بروز می‌نماید. در برخی از گیاهان علائم به شکل لکه‌های متحدالمرکز دیده می‌شود. با پیشرفت بیماری و انهدام بافت‌های گیاهی در اثر فعالیت آنزیم‌های پکتولیتیک، نقاط آسوخته به صورت خشک و کاغذی در آمده و گاهی اوقات وسط لکه‌های برگی نیز از بین می‌رود. در پوسیدگی نرم کاکتوس، بوته‌های آلوده از بخش‌های نزدیک سطح خاک شروع به پوسیدن کرده، با پیشروی بیماری بافت گوشتی کاکتوس له شده و بوی نامطبوعی از آن متصاعد می‌شود. بافت آلوده

بررسی اخیر، ارزیابی قابلیت این روش‌ها در تفکیک باکتری‌های مورد مطالعه و نیز ارزیابی شدت تنوع می‌باشد.

روش بررسی

نمونه برداری و جداسازی

طی بازدیدهای به عمل آمده در سال ۱۳۸۶ از گلخانه‌های گیاهان زینتی واقع در استان‌های گیلان، گلستان، شرق مازندران و شهر مشهد، گیاهان مختلف فیلودندرون (*Philodendron spp.*)، دیفن باخیا (*Dieffenbachia sp.*)، آگلونما (*Aglaonema sp.*)، پتوس (*Epipremnum aureum*)، کاکتوس (*Schlumbergera bridgesii*)، زنبق (*Iris sp.*)، آماریلیس (*Hippeastrum sp.*)، گیاه یخ (*Lampranthus sp.*)، فیکوس (*Ficus elastica*)، سینگونوم (*Syngonium podophyllum*) اسپاتیفیلوم (*Spathiphyllum sp.*)، مارانتا (*Maranta leuconeura*)، پپرومیا (*Peperomia sp.*)، سنسوریا (*Sansevieria trifasciata*) که دارای علائم لکه برگی و پوسیدگی نرم بودند، جمع‌آوری و درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند (جدول ۱). به منظور جداسازی عامل بیماری پس از شستشو با آب، از لکه‌های آبرسوخته روی برگ‌ها قطعاتی جدا و در چند قطره آب مقطر در داخل تشتک‌های سترون به کمک تیغ خرد گردید. پس از نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه، از سوسپانسیون حاصل قطره‌ای روی محیط EMB (Eosin Methylene Blue) مخطط گردید. تشتک‌ها در دمای 27°C نگهداری و پس از ۲۴-۴۸ ساعت، تک پرگنه‌های ریز برجسته با درخشندگی سبز متالیک انتخاب شده و برای خالص‌سازی دوباره روی محیط EMB به صورت خطی کشت گردید. از هر تشتک یک تک پرگنه انتخاب و روی محیط‌های آگار غذایی - سوکروز (NAS)، YDC (Schaad 2001) و

ایتروباکتریاسه و گونه‌های *Vibrio* نشان داده شده، با این حال ERIC-PCR برای طیف وسیعی از باکتری‌ها استفاده می‌شود (Wilson & Versalovic et al. 1991, 1994). در سایر موجودات آغازگرهای ERIC پس از اتصال به محل‌های دارای همولوژی نسبی، تکثیر را به صورت تصادفی انجام می‌دهند (Gillings & Holley 1997). به نظر می‌رسد توالی‌های REP در تاخوردگی‌های زنجیره‌های نوکلئوتیدی نقش دارند و با تثبیت mRNA در ناحیه بالادست در تنظیم بیان ژن دخالت می‌کنند (Martin et al. 1992). عنصر BOX اولین بار برای شناسایی و تفکیک گونه *Streptococcus pneumonia* استفاده شده است که محصول این توالی در بعضی از مراحل انتقال ژنتیکی یا بیماری‌زایی استرپتوکوکوس نقش دارد (Martin et al. 1992). از این آغازگرها در شناسایی و گروه‌بندی جنس‌های مختلف باکتریایی از جمله جدایه‌های *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (Toth et al. 1999) بیووارهای مختلف *Dickeya spp.* (Tsrer et al. 2009; Slawiak et al. 2009; Czajkowski et al. 2009) پاتووارهای *Pseudomonas syringae* (Weingart & Volksch 1997; Louws et al. 1994) نیز تعیین تنوع تاکسونومیک و ساختار فیلوژنتیکی استرین‌های زانتوموناس استفاده شده است (Rademaker et al. 2000). کارایی این روش در شناسایی و تمایز بین جدایه‌های اروینیا پکتولیتیک مولد لکه برگی و پوسیدگی نرم از گیاهان زینتی بررسی نشده است. لذا در مطالعه حاضر در ابتدا خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی، بیماری‌زایی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه بررسی شده سپس انگشت نگاری DNA ژنومی جدایه‌ها با rep-PCR انجام می‌پذیرد. هدف از انجام

جدول ۱. مناطق جمع‌آوری و علائم طبیعی جدایه‌های اروینیا‌های پکتولیتیک جدا شده از میزبان‌های زینتی در بخش‌هایی از شمال کشور

Table1. Host plants, symptoms, isolate number and the geographical areas of Northern Iran where samples of diseased plants were collected from.

علائم در میزبان Symptoms on Host	محل وقوع بیماری Location	میزبان Host	نام جدایه Name of isolate
لکه برگگی (leaf spot)	Mashhad	فیلودندرون (Philodendron)	PhM1
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	فیلودندرون (Philodendron)	PhM3
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	فیلودندرون (Philodendron)	PhM4
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	فیلودندرون (Philodendron)	PhM5
لکه برگگی (Leaf spot)	Gorgan-Golestan	فیلودندرون (Philodendron)	PhGi10
لهیدگی برگ (Leaf rot)	Mashhad	گیاه یخ (Ice plant)	IM2
لهیدگی برگ (Leaf rot)	Mashhad	گیاه یخ (Ice plant)	IM4
لهیدگی پیاز (Bulb rot)	Sari -Mazandaran	زنبق (Iris)	IrS1
لهیدگی پیاز (Bulb rot)	Sari -Mazandaran	زنبق (Iris)	IrS2
لکه برگگی (Leaf spot)	Gorgan-Golestan	پتوس (Pothos)	PetG1
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	پتوس (Pothos)	PetM3
لکه برگگی (Leaf spot)	Gorgan-Golestan	پتوس (Pothos)	PetG5
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan -Guilan	پتوس (Pothos)	PetGi8
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	سینگونیوم (Syngonium)	SynGi4
پوسیدگی نرم (Soft rot)	Mashhad	کاکتوس (Cactus)	KM2
پوسیدگی نرم (Soft rot)	Mashhad	کاکتوس (Cactus)	KM5
پوسیدگی نرم (Soft rot)	Amol- Mazandaran	کاکتوس (Cactus)	KA
پوسیدگی نرم (Soft rot)	Kordkooy- Golestan	کاکتوس (Cactus)	KG6
پوسیدگی نرم (Soft rot)	Kordkooy- Golestan	کاکتوس (Cactus)	KG7
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	آگلونما (Aglaonema)	AgM1
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	آگلونما (Aglaonema)	AgM2
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	آگلونما (Aglaonema)	AgM7
لکه برگگی (Leaf spot)	Chaboksar - Guilan	آگلونما (Aglaonema)	AgGi12
لکه برگگی (Leaf spot)	Chaboksar - Guilan	آگلونما (Aglaonema)	AgGi131
لکه برگگی (Leaf spot)	Chaboksar - Guilan	آگلونما (Aglaonema)	AgGi15
لکه برگگی (Leaf spot)	Amol- Mazandaran	دیفن باخیا (Dieffenbachia)	DA
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	دیفن باخیا (Dieffenbachia)	DGi2
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	دیفن باخیا (Dieffenbachia)	DGi6
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	دیفن باخیا (Dieffenbachia)	DGi61
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	دیفن باخیا (Dieffenbachia)	DGi7
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	فیکوس (Ficus)	FM1
لکه برگگی (Leaf spot)	Mashhad	فیکوس (Ficus)	FM2
لهیدگی برگ (Leaf rot)	Mashhad	پپرومیا (Peperomia)	PeM
لکه برگگی (Leaf spot)	Sari -Mazandaran	آماریلیس (Amaryllis)	AmaS1
لکه برگگی (Leaf spot)	Sari -Mazandaran	آماریلیس (Amaryllis)	AmaS3
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	مارانتا (Marantha)	MaGi11
لهیدگی برگ (Leaf rot)	Amol - Mazandaran	سنسوریا (Sansevieria)	SanA
لکه برگگی (Leaf spot)	Lahijan - Guilan	اسپاتیفیلوم (Spathiphyllum)	SpaGi3

D. chrysanthemi (جدا شده از سیب زمینی اصفهان، هدایی دکتر مسعود بهار، دانشگاه صنعتی اصفهان) در آزمون‌های الکتروفورز پروتئین و اثبات بیماریزایی به عنوان شاهد استفاده شدند.

آزمون اثبات بیماریزایی

به منظور ارزیابی قابلیت جدایه‌ها در ایجاد لکه برگگی، روی گیاهان آگلونما، دیفن باخیا، فیلودندرون، سینگونوم، اسپاتیفیلوم، پتوس و پوسیدگی نرم در کاکتوس آزمون بیماریزایی انجام شد. گیاهان یاد شده (اهدایی واحد گلخانه گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری) که دارای برگ‌های جوان و عاری از علائم بودند، در آزمون به کار برده شدند. یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری واجد 10^7 cfu (در میلی‌لیتر)، توسط سرنگ به پشت برگ‌ها تزریق گردید (Boccaro et al. 1991). از گیاهان مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بوته‌ها به طور روزانه برای مشاهده واکنش به بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. ده روز پس از بروز علائم، جداسازی مجدد باکتری انجام گرفت.

انگشت‌نگاری DNA ژنومی

از کشت ۲۴ ساعته، ۲۳ جدایه نماینده و ۱۱ جدایه استاندارد (جدول ۲)، در آب مقطر سترون، سوسپانسیونی با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و به هر یک از آنها ۵٪ KOH به میزان ۰/۱ حجم نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه جوشانده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی به عنوان DNA الگو استفاده شد

NGM (Lee & Yu 2006) کشت شد. برای ارزیابی‌های بعدی جدایه‌ها به صورت سوسپانسیون در آب مقطر سترون و مخلوط آب مقطر سترون و گلیسرین (۱:۱/۲) به ترتیب در یخچال و فریزر 7°C - نگهداری شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

تعداد ۳۸ جدایه از میزبان‌های زینتی از استان‌های یادشده جمع‌آوری شدند و آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای بر اساس روش‌های استاندارد در باکتری‌شناسی روی آنها صورت گرفت (Schaad et al. 2001, Hauben et al. 2006).

مقایسه نقوش پروتئین‌های سلولی

از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها روی محیط آگار غذایی (NA)، سوسپانسیونی با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با غلظت حدود 10^8 cfu (در میلی‌لیتر) با دستگاه اسپکتروفتومتر تهیه شد. به اندازه ۰/۱ حجم نمونه، محلول سدیم دو سیل سولفات 10° ٪ به هر لوله اضافه شد و نمونه‌ها به مدت دو دقیقه جوشانده سپس به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه با امواج فراصوت در دستگاه سونیکاتور (UP200H-Hielscher, Germany) هموژن شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. فاز رویی به لوله‌های جدید منتقل و پس از اضافه کردن نصف حجم گلیسرول، در 20°C - نگهداری شدند. الکتروفورز پروتئین در ژل جداکننده ۱۰٪ پلی‌اکریلامید در سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) انجام گرفت. مراحل رنگ آمیزی ژل به روش قبلی (Ahmadvand & Rahimian 2005) انجام شد. جدایه‌های *Dickeya zeae* (تهیه شده از مرکز نگهداری کشت‌ها، ICMP نیوزلند)، زیرگونه *Pcc* و جدایه E12 گونه

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های استاندارد تهیه شده از مراکز نگهداری IBSBF و ICMP

Table 2. Characteristics of reference isolates received from IBSBF and ICMP culture collections

نام و محل کلکسیون کشت Culture collection	نام جدایه Isolate name	کد جدایه Isolate code
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	863
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	1814
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	1819
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	787
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	807
IBSBF برزیل	<i>Pectobacterium cacticida</i>	1951
IBSBF برزیل	<i>Dickeya zeae</i>	852
IBSBF برزیل	<i>Dickeya dianthicola</i>	856
IBSBF برزیل	<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>chrysanthemi</i>	231
IBSBF برزیل	<i>Dickeya chrysanthemi</i> bv. <i>parthenii</i>	994
ICMP نیوزلند	<i>Dickeya paradisiaca</i>	2349

ترتیب برای آغازگرهای REP, BOX و ERIC، دمای گسترش 72°C به مدت ۶۰ ثانیه (REP, BOX) و 24°C ثانیه (ERIC) انجام شد. طویل شدن نهایی رشته‌های DNA به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C برنامه‌ریزی شد. هفت میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر تریس-بورات-EDTA با شدت جریان ۷۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید. برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر ۱۰۰bp (Bioneer, Korea) استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، عکس‌برداری با استفاده از Gel documentation انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و داده‌های مولکولی از طریق محاسبه میزان شباهت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه ساده (Simple matching, SM) و ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) انجام گرفت و

(Arabi et al. 2006). انگشت نگاری DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای BOXAIR; ERICIR/ ERIC2 و REP2/REP1R بر اساس روش‌های توصیه شده با کمی تغییر انجام شد (Versalovic et al. 1991, Gillings & Holly 1997, Weingart and Volksch 1997). واکنش‌ها به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl_2 ، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط dNTP، ۱۰ پیکو مول از هر یک از آغازگرها، ۱/۵ میکرولیتر DNA قالب و ۱/۵ واحد پلیمراز تگ (شرکت سیناژن) انجام شد. از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems 2720(U.S.A) برای تکثیر DNA استفاده شد. به هر لوله اپندورف حاوی آغازگرهای Rep، ۱/۵ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه شد. تکثیر با برنامه دمایی ۴ دقیقه در 94°C ، سپس ۳۴ چرخه 94°C به مدت ۵۰ ثانیه (REP, BOX) و ۳۰ ثانیه (ERIC)، دماهای اتصال 50°C ، 40°C و 52°C به مدت ۴۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه به

سعی شد میزان شباهت آنها در هر دو جنس *Dickeya* و *Pectobacterium* ارائه گردد.

گروه اول متشکل از دو زیر گروه بود. زیر گروه اول شامل جدایه‌های Dgi61، Di2، DGi6، PetG1، AgGi15 در بخش اول قرار گرفته‌اند و چهار جدایه اول بر اساس عدم تولید اسید از آرابینوز و مایو اینوزیتول و نیز تولید اسید از لاکتوز، ملی بیوز و رافینوز *D. ch. chrysanthemi* تشخیص داده شدند. در حالی که Dgi61 با وجود تفاوت در آزمون‌های هیدرولیز کازئین، لستین و تولید اسید از اینولین و مایو اینوزیتول مشابه گونه *D. zea* بود. از طرفی کلیه اعضای این بخش به استثنای Dgi61 با تفاوت جزئی (تولید مواد احیا کننده از ساکارز) شبیه به گونه *P. atrosepticum* می‌باشند. ویژگی‌های مورد ارزیابی جدایه‌های KA، PetG5، DA، AgGi12، AgGi131، PeA که در بخش دوم این زیرگروه واقع شدند با خصوصیات گونه *D. ch. parthenii* مطابقت داشت. از اعضای حد واسط این بخش KA با اندکی تفاوت (تولید مواد احیا کننده از ساکارز و اسید از D-آرابیتول) و PeA به گونه *P. carotovorum subsp. cartovororum* نزدیک بودند. هم‌چنین جدایه PetG5 خصوصیات مشابه *P. betavascolorum* داشت ولی از نظر تولید مواد احیا کننده از ساکارز و استفاده از سیترات مشابه زیر گروه *Pcc* بود. اعضای زیر گروه دوم KM2، KG7، PhM4، IM4 خصوصیات مشابه با زیر گونه *Pcc* و نیز در مواردی نزدیک به گونه *D. ch. parthenii* داشتند. دو جدایه FM1 و FM2 این زیر گروه فقط در آزمون‌های هیدرولیز کازئین و لستین با ویژگی‌های *D. zea* همسانی نداشتند.

جدایه‌های گروه دوم (AgM1، AgM2) در ویژگی‌های افتراقی شبیه گونه *D. zea* بوده ولی تفاوت‌های مختصری

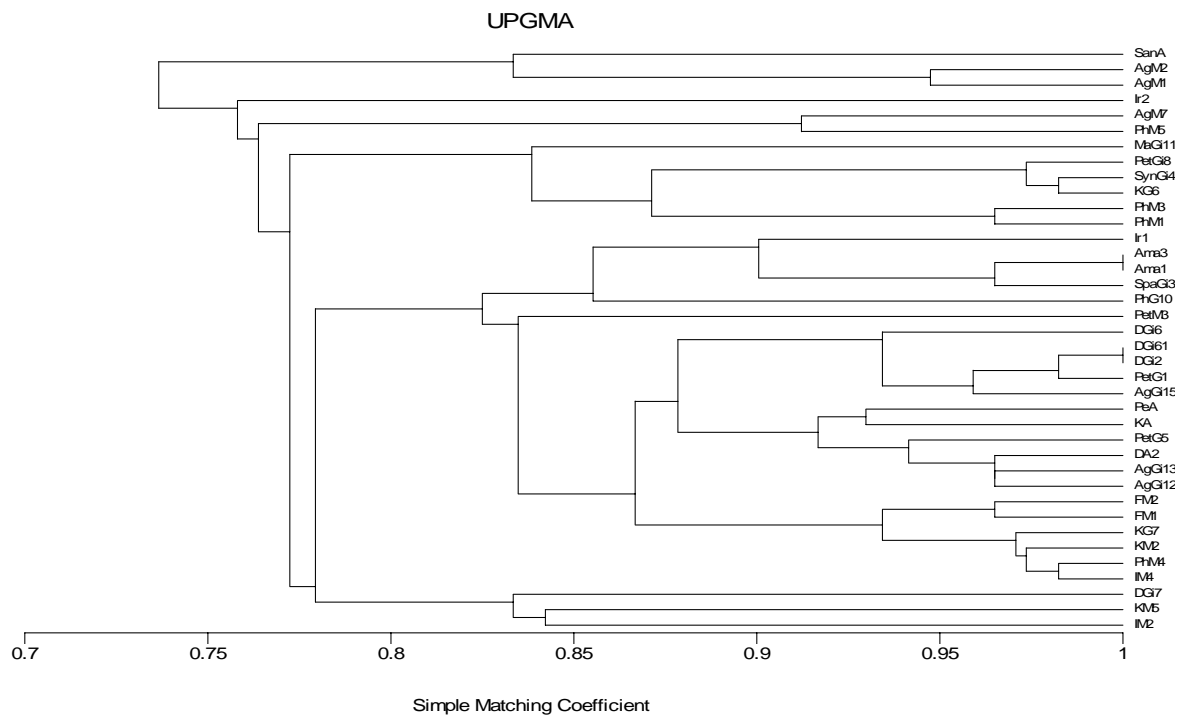
دندروگرام به روش UPGMA با استفاده از نرم افزار MVSP (Multivariate System Package, version 3.1) ترسیم گردید.

نتایج

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های به دست آمده از گیاهان زیتنی گرم منفی، اکسیداز منفی، اوره آز منفی، کاتالاز مثبت، بی‌هوازی اختیاری، دارای تاژک‌های محیطی و قادر به لهانیدن برش‌های سیب زمینی بودند. نیترات را احیا و از تیوسولفات سدیم، H_2S تولید کردند، پرگنه‌های جدایه‌ها روی محیط EMB گرد و برجسته یا تخت با حاشیه منظم و با درخشندگی سبز متالیک بود. پرگنه‌ها روی محیط NAS گرد، تخت یا اندکی برآمده و به رنگ شیری و یا سفید مایل به خاکستری بود. جدایه‌های IM4، FM1، FM2 در اطراف پرگنه روی محیط NGM رنگ قهوه‌ای تولید نمودند.

از بین جدایه‌های دارای ویژگی‌های یاد شده، ۳۸ جدایه بر اساس نه ویژگی افتراقی تولید اندول، رشد در $37^{\circ}C$ ، کاتابولیسم L-آرابینوز، مایو اینوزیتول، ترهالوز، α -متیل گلیکوزید، D-آرابیتول، D-مانوز، سوربیتول و مالونات (Samson et al. 2005) و ویژگی‌های دیگری چون تولید فسفاتاز، لسیتیناز، مواد احیا کننده از سوکروز، گاز از گلوکز، تولید اسید از مالتوز و D-آرابینوز، و مصرف سیترات از هم تفکیک گردیدند. بر پایه خصوصیات فنوتیپی (جدول ۳)، با در نظر گرفتن سطح تشابه ۸۵٪ از ماتریکس تشابه تهیه شده بر اساس ضریب تشابه ساده (SM)، جدایه‌های مورد بررسی در ۱۲ گروه قرار گرفتند (شکل ۱). از آنجایی که اعضای بعضی از گروه‌ها در ویژگی‌های مورد بررسی حالت بینابینی داشتند، بنابراین



شکل ۱. دندروگرام رسم شده بر اساس خصوصیات فنوتیپى جدایه‌هاى اروینیاى پکتولیتیک جدا شده از گیاهان زینتى. نام جدایه‌ها در جدول ۱ داده شده است.

Fig. 1. Dendrogram obtained on the basis of phenotypic features of pectolytic *Erwinias* isolated from ornamental plants. Name of isolates have been given in table 1.

جدایه PhG10 به *D. ch. parthenii* شباهت داشت و فقط ویژگی تولید اسید از D-آرابینوز آن مثبت بود. هفت گروه باقی‌مانده هر کدام دربرگیرنده یک جدایه بودند. جدایه SanA به گونه *D. ch.* شباهت داشت. بر اساس جداول افتراقى پکتوباکتریوم‌ها، خصوصیات این جدایه، حد واسط زیرگونه‌هاى *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*، *P. betavascolorum*، جدایه‌هاى IrS2 و PetM3 به ترتیب با زیرگونه *Pcc* و گونه *Pb* (به استثنای تولید اسید از سوربیتول و مواد احیاکننده از ساکارز) همسانی داشتند. جدایه‌هاى MaGi11 و KM5 بر اساس ویژگی‌هاى مورد ارزیابى با گونه *D. ch. parthenii* مطابقت داشتند. MaGi11 در دسته بندى پکتوباکتریوم‌ها با مختصرى

(هیدرولیز کازئین، تولید اسید از D آرابینوز و مایواینوزیتول) با این گونه داشتند و نیز در تقسیم‌بندى پکتوباکتریوم‌ها مشابه به زیر گونه *Pcc* بودند. گروه سوم که شامل دو جدایه PhM5 و AgM7 بود، با توجه به ویژگی‌هاى مورد ارزیابى با مختصرى تفاوت (تولید اسید از D-آرابیتول و تولید قلیا از سیترات) به زیر گونه *Pcc* شباهت داشت. ویژگی‌هاى اعضاى گروه چهار (PhM1, PhM3, SynGi4, PetGi8, KG6) مطابق با زیرگونه *Pcc* بود. چهار جدایه اول گروه پنجم (Irs1, Ama1, Ama3, SpaGi3) با اندكى تفاوت (تولید اسید از اینولین و مایواینوزیتول) مشابه گونه *D. zea* بودند. در حالى که

در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌ها، ۱۰-۷ روز بعد از مایه‌زنی ظاهر شد. نشانه‌های بیماری به صورت لکه‌های آبسوخته با هاله زرد رنگ بروز کرده و به تدریج نکروز شد. روی آگلونما نسبت به سایر گونه‌های گیاهی لکه‌های آبسوخته زودتر ظاهر شد و نیز نسبت بیشتری از نقاط مایه‌زنی شده، علائم را نشان داد (شکل ۳-۳A). در حالی که روی پتوس لکه‌ها نسبت به نواحی مایه‌زنی شده، پیشرفت کمی داشت. در کاکتوس علائم به صورت قهوه‌ای شدن بافت، له شدگی و در نهایت خشکیدگی کل گیاه بود (شکل ۳-۳B). جدایه‌هایی از کاکتوس، سینگونیوم و زنبق که در آزمون‌هایی فنوتیپی، با مختصری تفاوت، به زیر گونه *Pcc* شباهت داشتند، لکه‌های آبسوخته بزرگ‌تری را در مدت زمان کوتاه‌تری روی گیاه آگلونما ایجاد نمودند. در برگ‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون هیچ‌گونه علائمی مشاهده نگردید. از لکه‌های ایجاد شده روی اندام‌های مایه‌زنی شده پس از ده روز جداسازی مجدد باکتری انجام شد. تعدادی از آزمون‌های کلیدی (از جمله مرفولوژی پرگنه، کاتابولیسیم تخمیری گلوکز، هضم ژلاتین، کازئین و چربی و استفاده از دو یا سه منبع کربنه) برای اطمینان از همسانی جدایه به دست آمده با جدایه به کار برده شده در مایه‌زنی، صورت گرفت.

انگشت نگاری DNA ی ژنومی

بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی، ۲۳ جدایه نماینده انتخاب شد و تکثیر آنها به همراه ۱۱ جدایه استاندارد (جدول ۲) در *rep-PCR* با به کارگیری آغازگرهای متداول صورت گرفت. الگوهای بانندی حاصل از تکثیر جدایه‌ها در نرم افزار Photocapture در کنار نشانگر وزن مولکولی تعیین وزن شد. پس از ترسیم ماتریکس صفر و یک و تعیین درصد

تفاوت (تولید اسید از لاکتوز و دی آرابیتول) به زیر گونه *Pcc* تعلق داشت.

جدایه‌های *DGi7* و *IM2* خصوصیتی مشابه گونه *D. ch.* و زیر گونه *Pcc* داشتند.

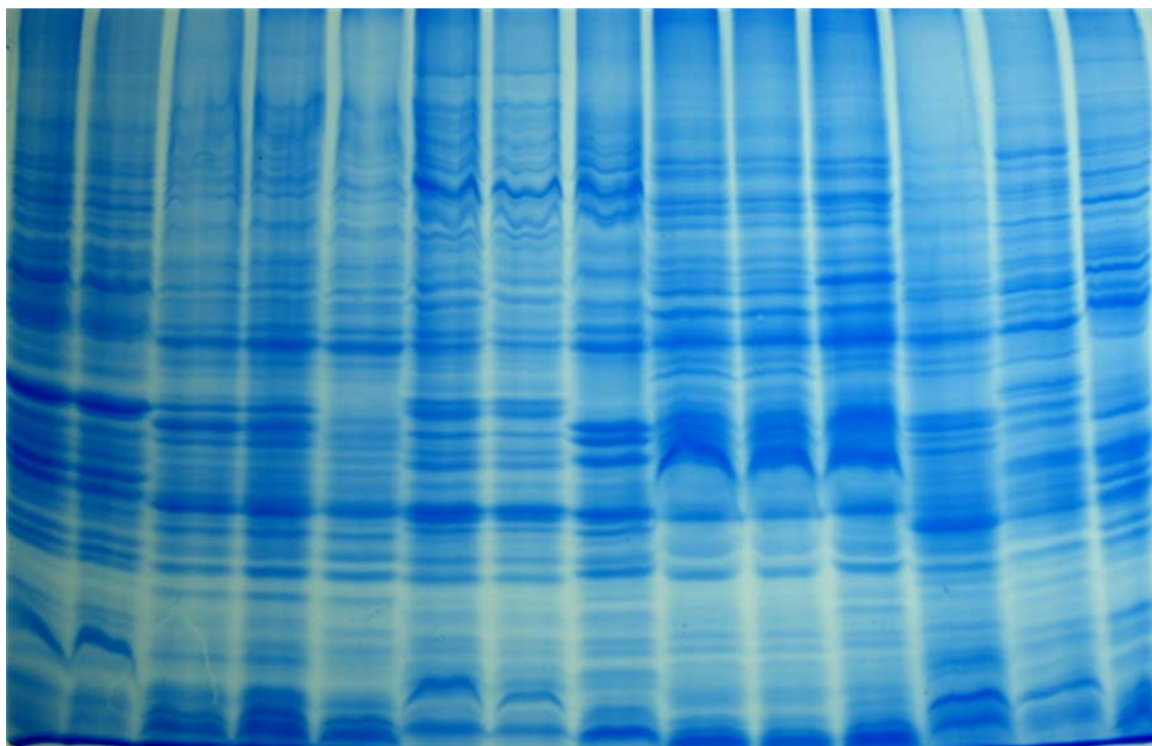
الگوی پروتئین سلولی جدایه‌ها

الگوی پروتئینی ۳۸ جدایه مورد بررسی در ژل پلی اکریلامید با یکدیگر و با جدایه‌های مرجع *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، *D. zea* و جدایه E12 سیب زمینی اصفهان مقایسه شد (شکل ۲). تفاوت قابل ملاحظه‌ای در الگوی پروتئینی جدایه‌ها وجود داشت. الگوی پروتئینی جدایه‌های *IM4*، *FM1*، *FM2*، *PeA*، *PhM4* تا حدودی به جدایه *D. zea* شباهت داشت. الگوی پروتئینی جدایه‌های *AgM1* و *AgM2* (آگلونما) با *SanA* (سنسوریا) و نیز جدایه‌های *DGi2*، *DGi6* و *DGi61* (دیفن باخیا) با *AgGi15* (آگلونما) شبیه یکدیگر بود. هم‌چنین جدایه‌های *FM1* و *FM2* (فیکوس)، *PhM4* (فیلودندرون) و *IM4* (گیاه یخ) الگوی پروتئینی مشابهی داشتند. جدایه‌های *SynGi4* (سینگونیوم)، *KG6* (کاکتوس)، *PetGi8* (پتوس) بر اساس نقوش پروتئینی در یک گروه قرار گرفتند.

آزمون بیماری‌زایی

تمامی ۳۸ جدایه به آگلونما مایه‌زنی شدند. بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده از فیلودندرون، دیفن باخیا، پتوس، کاکتوس، سینگونیوم، اسپاتیفیوم نیز روی میزبان‌هایی که از آنها جدا شده بودند، نیز ارزیابی گردید. سه جدایه *PetGi8*، *SynGi4*، *KG6* که دارای شدت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها بودند، به هر هفت گونه گیاهان آزمون نیز مایه‌زنی شدند. علائم بیماری

PhM1 PhM3 FM1 FM2 PhM4 AgM7 PhM5 PhG10 AgM1 AgM2 SanA AgGi12 AgGi131 AgGi15



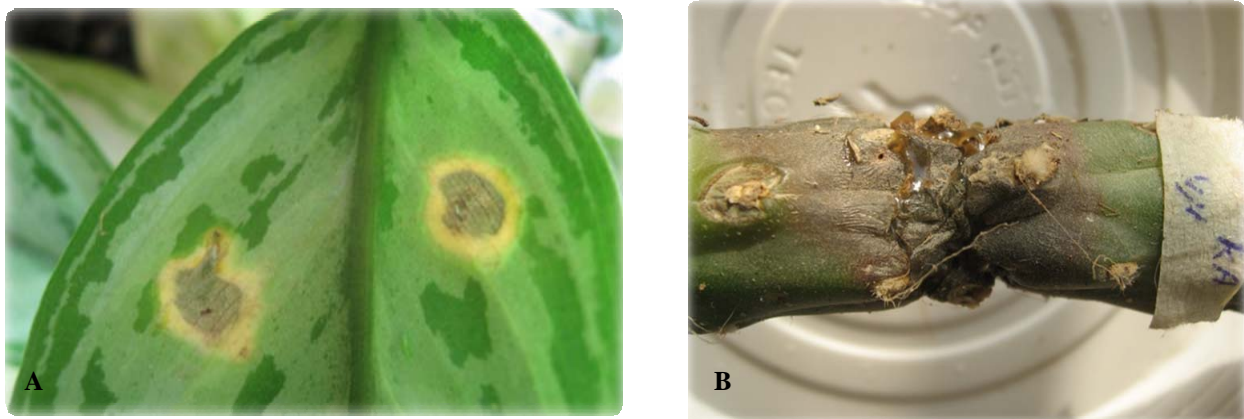
شکل ۲. مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی استرین‌های اروینیایی پکتولیتیک جدا شده از گیاهان زینتی در ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪. نام جدایه‌ها در جدول ۱ داده شده است.

Fig. 2. Comparison of electrophoretic pattern of cell proteins of pectolytic *Erwinia* isolated from ornamental plants in 10% polyacrylamide gel. Name of isolates have been given in table 1.

باخیا در سه گروه دسته‌بندی شدند. DGi7 به همراه *DA, D. ch* در کنار *Pcc* و *D. paradisiaca* و DGi2 با جدایه‌های PhM1, PhG10 (فیلودندرون)، PetGi1 (پتوس) و *Pa*، هر کدام در یک گروه مجزا قرار گرفتند. هم‌چنین جدایه‌های زنبق در دو گروه متفاوت قرار گرفتند. جدایه IrS2 در کنار *Pcc* و IrS1 با جدایه استاندارد *D. zea* و نیز SpaGi3 (اسپاتیگیلوم) گروه‌بندی شدند که مطابق با تقسیم‌بندی فنوتیپی بود. از ۱۵ گروه مشخص شده در روش BOX-PCR، سه گروه متعلق به استانداردها بود. قطعات تکثیری در این روش در محدوده ۱۹۵۰-۱۸۰ جفت بازی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تکثیر با این آغازگر، جدایه‌های AgM2 (آگلونما) و PetG5 (پتوس)

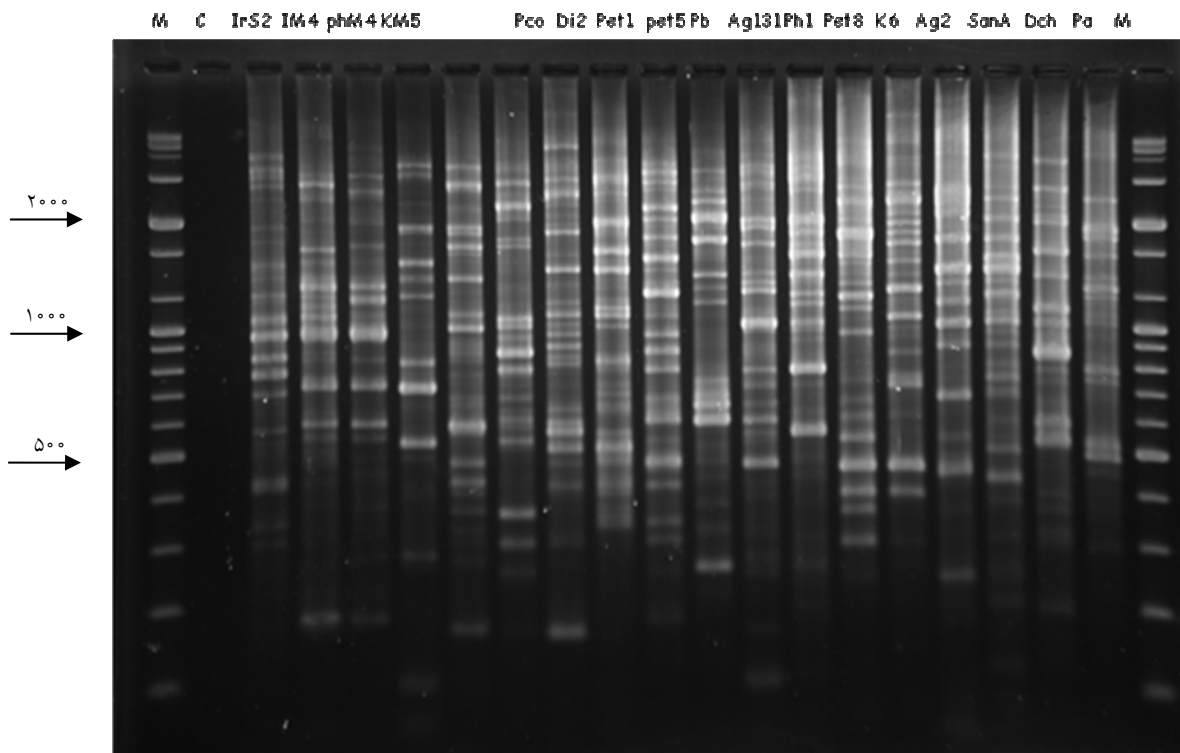
شباهت جدایه‌ها با ضریب جاکارد (Jaccard)، نقوش الکتروفورزی قطعات DNA تکثیر شده جدایه‌ها با آغازگرهای REP, ERIC و BOX، در سطح شباهت ۲۴ درصد بررسی شد.

تعداد قطعات تکثیر شده در روش Eric-PCR بین ۱۲-۲۳ و طول آنها بین ۵۷۰-۱۸۰ جفت باز بود (شکل ۴). در سطح تشابه ۲۴ درصد نشانگرهای REP, ERIC و BOX، جدایه‌های حاضر را به ترتیب به ۱۳، ۲۱ و ۱۵ گروه تقسیم نمودند. هر سه آغازگر جدایه‌ها را متفاوت از هم گروه‌بندی کردند. جدایه‌های KM2 (کاکتوس) و PhM4 (فیلودندرون) در هر سه روش، الگوی ژنتیکی مشابهی را نشان دادند. در ERIC-PCR، جدایه‌های نماینده دیفن



شکل ۳. علائم لکه برگی آبسوخته روی آگلونما (A) و لهیدگی روی کاکتوس (B) مایه‌زنی شده با جدایه‌های اروینیای پکتولیتیک.

Fig. 4. Translucent leaf spot on *Aglaonema* (A) and soft rot on *Cactus* (B) inoculated with pectolytic *Erwinia*.



شکل ۴. نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA ی جدایه‌ها با ERIC-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪. نام جدایه‌ها و استانداردها در جدول ۱ و ۲

داده شده است. M: شاخص جرم مولکولی، C: شاهد منفی

Fig. 4. ERIC-PCR fingerprints of bacterial isolates on 1.5 % Agarose gel. Name of isolates and references have been given in table 1 and 2. M: DNA size Marker, C: negative control.

تنوع بیشتری را نشان دادند. تمامی جدایه‌ها ویژگی‌های یکسانی در آزمون‌های کلیدی مانند تحمل نمک طعام ۵٪، عدم حساسیت به اریترومایسین، تولید آر جی نین دی هیدرولاز، تولید اسید از D-مانوز، ترهالوز، اینولین و استفاده از گلوتامات و گلوکونات داشتند. بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، 12 گروه در سطح شباهت ۸۵٪ قابل تمایز بودند.

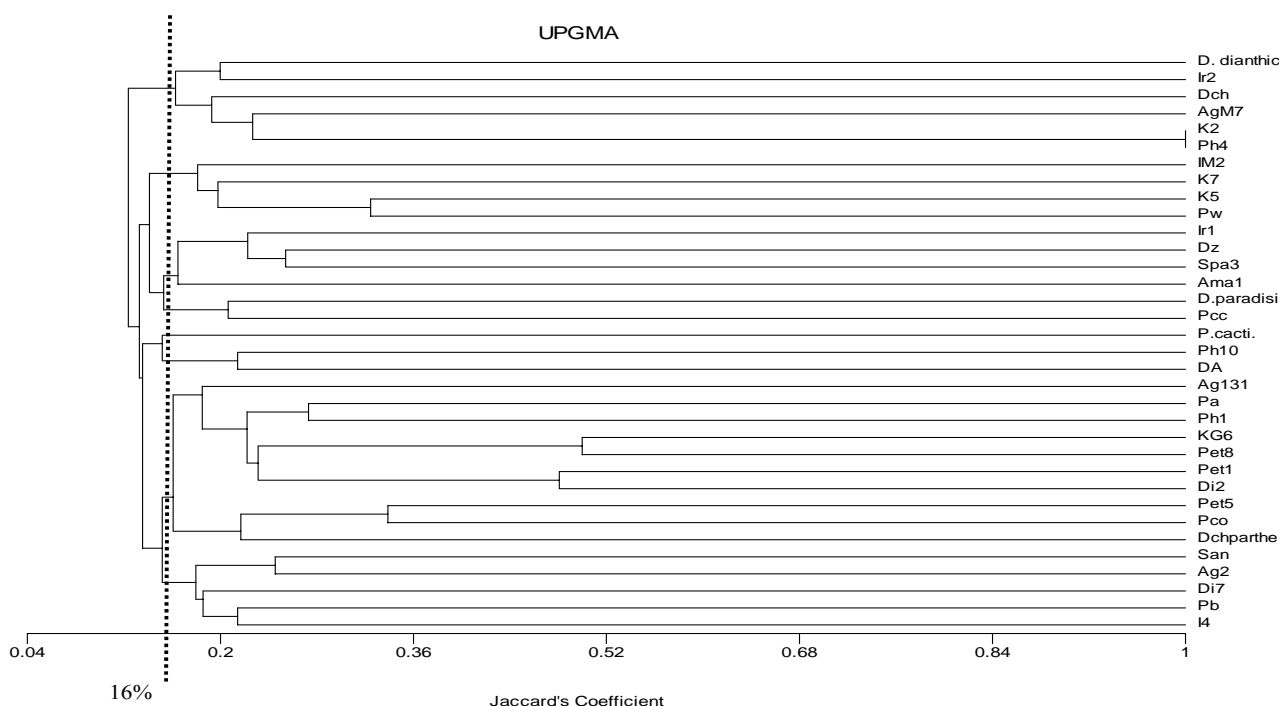
نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی بین جدایه‌های مورد مطالعه نیز تنوع بالایی را نشان داد که دلالت بر غیرهمگن بودن این جدایه‌ها دارد. این روش تنها در دسته‌بندی مقدماتی جدایه‌ها مفید بود. اروینیاها عامل پوسیدگی نرم روی طیف وسیعی از گیاهان بیماری‌زا بوده و محدودیت میزبانی چندانی ندارند (Barras et al. 1984). بیماری‌زایی سه جدایه KG6، SynGi4 و PetGi8 به ترتیب از کاکتوس، سینگونیم و پتوس روی هر هفت گونه گیاه زینتی دلالت بر این امر دارد. جدایه‌ها از نظر شدت علائمی که روی گیاه آگلونما ایجاد کردند، متفاوت بودند. شدت بیماری در جدایه‌هایی از کاکتوس، سینگونیم و زنبق در مقایسه با استانداردهای به کار برده شده در آزمون بیماری‌زایی، بیشتر بود. بر اساس زمان ظهور علائم و نیز اندازه لکه‌های روی برگ نسبت به نواحی مایه‌زنی شده، بهترین گیاه برگی برای بررسی آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های زینتی، آگلونما بود. جدایه‌های به دست آمده از کاکتوس روی گیاه مربوطه نشانه‌های تپیک پوسیدگی نرم را نیز ایجاد نمودند.

دندروگرام‌های مشتق شده از نتایج تکثیر جدایه‌ها با هر سه نشانگر متفاوت بود. این نتیجه با توجه به تعداد متفاوت باندهای تکثیر شده، دمای اتصال مربوط به هر آغازگر و پراکندگی عناصر تکراری هدف در ژنوم جدایه‌ها، دور از انتظار نبود (Rademarker et al. 2000).

همراه استانداردهای *Pcc* و *D. ch.* و نیز جدایه‌های KM2 و PhM4 به ترتیب از کاکتوس و فیلودندرون به همراه *D. ch.* در گروه‌های جداگانه قرار داد. تعداد قطعات تکثیر شده با REP-PCR نیز بین ۱۲-۶ عدد بود. در این روش تفاوت زیادی بین الگوی باندهای جدایه‌ها در مقایسه با استانداردها دیده شد. با ترکیب نتایج به دست آمده از هر کدام از روش‌های ERIC-PCR، BOX-PCR و REP-PCR دندروگرام ترکیبی آنها ترسیم گردید (شکل ۵). در سطح تشابه ۱۶٪، استانداردها در بین جدایه‌های به دست آمده از گیاهان زینتی پراکنده شدند و فقط *P. cacticida* به صورت یک گروه مجزا در دندروگرام قرار گرفت. جدایه‌های KM2، PhM4، AgM7، IrS2 همراه با *D. ch.* و *D. dianthicola* در یک گروه واقع شدند. جدایه‌های IM2، KG7 و KM5 به همراه جدایه *Pw* یک گروه جداگانه را ایجاد کردند. جدایه‌های IrS1، SpaGi3 و AmaS1 در کنار جدایه استاندارد *Dz* قرار گرفتند که با گروه‌بندی فنوتیپی مطابقت داشت.

بحث

در تحقیق حاضر، ۳۸ جدایه اروینیاها پکتولیتیک مولد لکه برگی و پوسیدگی نرم قسمت‌های هوایی گیاهان زینتی برخی مناطق شمالی کشور، بررسی شدند. تنوع قابل ملاحظه‌ای در خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌ها دیده شد. بر اساس صفات تفکیکی موجود در جداول افتراقی اروینیاها (پکتولیتیک (Schaad et al. 2001, Hauben et al. 2006)، جدایه‌ها، در آزمون‌های تولید اندول، فسفاتاز، مواد احیاکننده از ساکارز و گاز از گلوکز، هیدرولیز ژلاتین، کازئین و نیز در تولید اسید از قندهای سوربیتول، مایو اینوزیتول، دی آرابینوز، دی آرابتول، ادونیتول، آلفا متیل گلیکوزید



شکل ۵. دندروگرام مربوط به ارتباط جدایه‌های اروینیای پکتولیتیک جدا شده از گیاهان زیتنی آلوده به لکه برگ‌گی و پوسیدگی نرم بر اساس نتایج حاصل از rep-PCR.

Fig. 5. Dendrogram showing the relationship between pectolytic *Erwinias* isolated from leaf spot and soft rot infected ornamental plants based on rep-PCR.

برای مثال جدایه SanA در یک سری صفات مشابه *D. ch.* و در صفاتی دیگر به *Pcc* و *Pb* شبیه بود. در حالی که rep-PCR، این جدایه را با گونه *Pb* در یک گروه قرار داد. جدایه Ir2 در ویژگی‌های بیوشیمیایی در کنار *Pectobacterium* قرار گرفت. و در آزمون‌های مولکولی با *Dickeya* دسته‌بندی شد. با وجود مشاهده هم‌بستگی نسبی صفات بیوشیمیایی جدایه‌های مطالعه حاضر با جدایه‌های استاندارد، الگوهای پیچیده اثر انگشت DNA ی ژنومی، امکان مقایسه جدایه‌های به دست آمده از گیاهان زیتنی آلوده و استانداردها را مشکل می‌سازد. به نظر می‌رسد جداسازی جدایه‌ها از گیاهان زیتنی مختلف، در تفاوت‌های ژنتیکی بین

نقوش حاصل از تکثیر DNA ی جدایه‌ها با آغازگرهای ERIC، قابلیت بیشتری در تفکیک جدایه‌ها داشت. هم‌چنین ERIC-PCR نسبت به دو روش دیگر جدایه‌های استاندارد را بهتر در کنار جدایه‌های زیتنی قرار داد. با هر سه روش تنوع موجود درون جدایه‌های به دست آمده از هر گونه گیاه زیتنی نیز قابل مشاهده بود. با وجود این‌که قلمه‌های گیاهان زیتنی از استان‌های شمالی کشور به مناطق دیگر (شهر مشهد) برده می‌شود ولی تنوع در استرین‌های جدا شده از این دو منطقه دیده شد. هم‌چنین در چندین مورد گروه‌بندی ژنتیکی با فنوتیپی همسانی نداشت. صفات بیوشیمیایی، تعدادی از جدایه‌ها را حد واسط دو جنس *Dickeya* و *Pectobacterim* قرار داد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (61-64) متن انگلیسى مراجعه شود.

جدایه‌ها تأثیرگذار باشد. در هر حال rep-PCR در گروه‌بندى جدایه‌هاى اروینیاى پکتولیتیک از قابلیت كافی برخوردار نیست .