بیماری لکه برگی باکتریایی خاکشیر تلخ ناشی از یک پاتووار مشابه با *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* *

BACTERIAL LEAF SPOT OF *Sisymbrium irio* INCITED BY A PATHOVAR CLOSELY SIMILAR TO *Pseudomonas syringae* PV. *maculicola*

پژمان خدایگان[۱]، حشمت‌اله رحیمیان [۲]**، مسعود شمس بخش[۱] و علی برزگر[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۸/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۱۶)

چکیده

در بهار سال ۱۳۸۲ یک بیماری لکه برگی روی بوته‌های خاکشیر وحشی یا تلخ (*Sisymbrium irio*) در منطقه پلور استان تهران دیده شد. لکه‌ها مدور تا نامنظم، قهوه‌ای تا سیاه رنگ، نکروزه، به قطر نیم تا یک و نیم میلی‌متر و اغلب دارای هاله سبز کمرنگ تا زرد بودند. با کشت نمونه‌های آلوده روی محیط آگار غذایی حاوی ساکارز، یک سودوموناس لوان مثبت جدا گردید.جدایه‌ها در محیط Kings B تولید رنگدانه سبز فلورسنت کردند. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها شباهت بسیار بالایی با پاتووار *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* نشان دادند. جدایه‌ها در خاکشیر وحشی بیماری‌زا بوده و برخی توانایی تولید زهرابه کروناتین را داشتند. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cfl* در همه جدایه‌ها یک قطعه ۶۹۰ بازی تکثیر گردید. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها به جدایه‌های استاندارد *P. s.* pv. *maculicola* و *P. s.* pv. *tomato* شبیه بود. در الگوی انگشت نگاری DNA حاصل از rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP-PCR, BOX-PCR وERIC-PCR جدایه‌ها با دو پاتووار مذکور حدود ۲۰ درصد شباهت داشتند. براساس مجموع ویژگی‌های فتوتیپی، بیماری‌زایی و ژنوتیپی می‌توان باکتری عامل لکه برگی در خاکشیر وحشی را، به عنوان جدایه‌های غیر عادی *P. s.* pv. *maculicola* و یا احتمالاً پاتووار جدیدی معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: خاکشیر تلخ، لکه برگی باکتریایی و *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

---

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

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

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. به ترتیب استاد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

خاکشیر (*Sisymbrium* spp.) یکی از گیاهان خانواده Brassicaceae است که در برخی از مزارع و باغ‌ها به شکل علف هرز روئیده و بذر برخی از گونه‌های آن استفاده داروئی دارد. در مورد بیماری‌های این گیاه اطلاعات زیادی در دسترس نیست. اعضای دیگر این خانواده مانند خردل سیاه (*Brassica nigra*(L.) W. D. J. Koch)، شلغم (*Brassica napus* L. var. *napus*) و انواع کلم‌ها، میزبان گونه‌های بسیاری از باکتری‌های ایجاد کننده لکه برگی از جمله *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *P. viridiflava*, *P. cichorii* و *P. marginalis* است (Fahy & Hayward 1983, Bradbury 1986). باکتری *P. s.* pv. *maculicola* و پاتووار نزدیک به آن یعنی *P. s.* pv. *tomato* از جمله بیمارگرهایی هستند که اعضای خانواده مذکور را آلوده می‌کنند. این دو پاتووار درتقسیم بندی ارائه شده توسط *گاردان و همکاران* از اعضای گونه ژنومی سه *P.syringae* محسوب می‌شوند (Gardan *et al.* 1999). باکتری *P. s.* pv. *maculicola* ایجاد کننده لکه برگی و در مواردی بلایت گیاهان تیره چلیپائیان در بسیاری از مناطق دنیاست و بیش از ۲۵ گونه و رقم متعلق به این تیره، میزبان آن هستند (Cintas *et al* 2002). این پاتووار در آرژانتین از لکه‌های نکروزه روی برگ‌های کلم گل (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)، در استرالیا از شلغم روغنی (*Brassica rapa* L. var. *rapa*)، خردل سفید (*Brassica hirta* Moench)، خردل هندی *Brassica juncea* (L.) Czern. var. *crispifolia* L. H. (Bailey) و خردل سیاه (*Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch)، در آمریکا از کلم پیچ (*Brassica* var. *capitata* L.) *oleracea* و خردل جداسازی شده است (Zhao *et al.* 2000, Peters *et al.* 2000 ,Wiebe & Campbell 1993).

علائم لکه برگی‌های ناشی از *P. s.* pv. *maculicola*، بروز لکه‌های نکروزه، کوچک و پراکنده در هر دو سطح برگ بوده که معمولاً هاله‌ای زرد رنگ اطراف آن را احاطه می‌کند. با پیشرفت بیماری لکه‌ها به یکدیگر پیوسته، سطح وسیع‌تری از برگ را نکروزه کرده و باعث کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌گردد (Peters *et al.* 2000). جدایه‌های *P. s.* pv. *maculicola* توان تولید زهرابه کروناتین (Coronatine) را دارند. این زهرابه سبب بروز کلروز در میزبان شده و به عنوان یکی از فاکتورهای دخیل در پرآزاری تلقی می گردد. تولید زهرابه یاد شده علاوه بر این پاتووار، در برخی دیگر از پاتووارهای گونه ژنومی سه نیز گزارش شده است (Bereswill *et al.* 1994). در مورد حضور و گسترش باکتری‌های آلوده کننده تیره کلم از جمله، *P. s.* pv. *maculicola* در ایران اطلاعات چندانی در دست نمی‌باشد. پاتووار *Xanthomonas compestris* pv. *incanae* از شب بو در ایران جداسازی شده است (Okhovatian & Rahimian 1982). خاکشیر از گیاهانی است که در بسیاری از مناطق ایران به صورت خود رو و گسترده رشد کرده و به اقلیم خاصی محدود نیست. اطلاعاتی درباره بیماری‌های باکتریائی این گیاه در دنیا و ایران وجود ندارد. برای اولین بار یک بیماری با علائم لکه برگی روی خاکشیر تلخ در استان تهران دیده شد. این بررسی به منظور شناسایی عامل این بیماری به انجام رسیده است. خلاصه نتایج بخشی از پژوهش انجام شده در زمینه معرفی بیماری، قبلاً نیز ارائه شده است (Arabi *et al.* 2002).

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی

از بوته‌های خاکشیر، دارای علائم لکه برگی، در منطقه پلور استان تهران نمونه‌هایی جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شد. بخش‌هایی از برگ که در برگیرنده لکه بودند پس از شستشو با آب، جدا شده و داخل تشتک‌های سترون حاوی چند قطره آب مقطر خرد گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، قطره‌ای از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت آگار غذایی حاوی نیم درصد ساکاروز (NAS, ۲۳ گرم nutrient agar، پنج گرم ساکاروز در یک لیتر آب) مخطط گردید. دو تا سه روز پس از کشت و نگهداری تشتک‌ها در دمای آزمایشگاه، پرگنه‌های برجسته و سفید رنگ، به قطر دو تا سه میلی‌متر در سطح محیط ظاهر شدند. تک پرگنه‌های مجزا برای خالص سازی و تکثیر روی محیط کشت King`s B (King *et al.* 1954) مخطط گردید.

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک طبق روش‌های متداول (Fahy & Hayward 1983، Lelliott & Stead 1987، Schaad *et al.* 2001) انجام شد. طیف منابع کربن قابل استفاده جدایه‌ها، با استفاده از محیط معدنی پایه *آیر*(Ayer) و *همکاران* (برگرفته از Schaad *et al.* 2001) بررسی شد. قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه با روش تندال (Tyndall) سترون و به غلظت نهایی ۰/۲ تا یک درصد به محیط پایه اضافه شد. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منابع کربنی بر اساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسیدیته محیط کشت نسبت به شاهد (محیط آیر فاقد منبع کربنی) تا سه هفته پس از کشت و نگهداری تشتک‌ها در دمای ۲۸°C–۲۵، ارزیابی گردید.

آزمون بیماری‌زایی

بذرهای گیاهان گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L. var. *lycopersicum*)، شلغم روغنی، کلم پیچ (*B. oleraces* L. var. *capitata*)، کلم گل (*B. oleracea* L. var. *botrytis*)، خردل (*Sinapis arvensis* L. var. *orientalis*(L.) W. D. J. Koch & Ziz)، منداب (*Eruca vesicaria*(L.) Cav. ssp. *sativa* (Mill.) Thell)، تربچه (*Raphanus sativus* L.) و ترتیزک (*Lepidium sativum* L.)، در شرایط گلخانه (دمای ۲۸°C – ۲۰) در گلدان‌های محتوی خاک شنی- لومی کاشته و در مرحله ۵ تا ۱۰ برگی، برای مایه‌زنی استفاده شدند. در مواردی گیاهچه‌ها یا بوته‌های کوچک خاکشی (*Sisymbrium altisimum* و *S. irio*) وکیسه کشیش (*Capsella bursa-pastoris*(L.) Medik) به صورت نشا از حاشیه مزارع انتخاب و به گلدان منتقل گردیدند. بوته‌ها ۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی در زیر کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند. جدایه‌های مورد بررسی، روی محیط NAS به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸°C کشت و سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml (بر اساس میزان کدری سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر و رقیق سازی و کشت سلول‌های رقیق شده روی محیط NAS و شمارش پرگنه) تهیه شد. سوسپانسیون با محلول پاش دستی روی و پشت برگ‌های گیاهان پاشیده و متعاقب آن برگ‌ها با فرو بردن سنجاق سترون زخم شدند. بخش دیگری از سوسپانسیون به غلظت معادل 10^4 cfu/ml رقیق شده و با کمک سرنگ به پشت برگ‌ها در چند نقطه تزریق شد. به عنوان شاهد از آب مقطر سترون برای تزریق و محلول پاشی استفاده شد. بعد از مایه‌زنی، بوته‌ها مجدداً در

زیر پوشش پلاستیکی تا ۴۸ ساعت قرار داده شد و پس از برداشتن پوشش، در گلخانه نگهداری و برای مشاهده علائم به صورت روزانه ارزیابی شدند (Arabi *et al*. 2006).

مقایسه الگوی پروتئین سلولی

جدایه‌های خاکشیر به همراه جدایه‌های استاندارد روی محیط NA کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، سوسپانسیونی از آنها در آب مقطر تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر با یک تنظیم شد. سلول‌ها با اضافه کردن یک دهم حجم نمونه، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰درصد و پنج دقیقه نگهداری در حمام آب جوش پاره شده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. از رونشین (Supernatant) حاصل به عنوان پروتئین‌های سلولی برای الکتروفورز استفاده گردید. الکتروفورز در حضور SDS در سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) با ژل متراکم کننده پنج درصد و متمایز کننده ۱۰ درصد و در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی آمپر انجام و با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل پایان پذیرفت. ژل در محلول رنگ آمیزی حاوی ۰/۱۲ درصد کوماسی بریلیانت بلو، ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک به مدت یک شب بر روی شیکر قرار داده شد. ژل در محلول ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک تا زمان آشکار شدن شدن نوارهای پروتئینی، رنگ بری و برای رنگ بری بیشتر زمینه، به اسید استیک هفت درصد منتقل گردید و از آن عکس گرفته شد (Ahmadvand & Rahimian 2005).

بررسی تولید زهرابه کروناتین در محیط کشت

محیط کشت HSC (Hoitink & Sinden broth medium) (۲۰ گرم گلوکز، یک گرم کلرید آمونیم, ۰/۲ گرم سولفات منیزیم، ۴/۱ گرم منو پتاسیم فسفات، ۳/۶ گرم دی پتاسیم فسفات و ۰/۳ گرم نیترات پتاسیم در یک لیتر آب مقطر) تهیه و پس از اتوکلاو، ۲۰ میکرومولار کلرید آهن سترون به آن اضافه گردید. محیط در لوله‌های آزمایش تقسیم و به هر لوله یک جدایه تلقیح گردید و لوله‌ها بر روی شیکر با چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. کشت‌ها در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و ۲۰ میکرولیتر از فاز رونشین بر روی برش‌های سیب زمینی که در تشتک‌های سترون قرار داشتند، ریخته شد و تشتک‌ها در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید. پس از پنج روز برش‌ها جهت مشاهده هیپرتروفی بررسی گردیدند (Schaad *et al*. 2001).

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌ها در محیط NA کشت شد. پس از دو روز رشد در دمای ۲۸°C– ۲۵، سلول‌ها در آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآمدند. کدری (OD) سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲ – ۰/۱ واحد تنظیم و به آنها ۰/۱ حجم هیدروکسید پتاسیم یک نرمال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه جوشانده شدند. از این نمونه‌ها، به عنوان DNA الگو (Template) در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) استفاده شد (Arabi *et al*. 2006). ازجدایه‌های استاندارد تهیه شده از کلکسیون نیوزیلند (International Collection of Microorganisms from Plants, Aackland, New Zeeland)، *P. s.* pv. *tomato* ICMP 3362 و

P. s. pv. *maculicola* ICMP 3935 نیز DNA استخراج و در انگشت‌نگاری به کار برده شد.

بررسی حضور ژن مولد کروناتین در جدایه‌ها به وسیله PCR

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۶۷ میلی‌مولار تریس با اسیدیته ۸/۸، ۱۶ میلی‌مولار سولفات آمونیم، ۱۰ میلی‌مولار مرکاپتواتانول، یک درصد توین ۲۰، ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر سرم آلبومین گاوی (BSA)، پنج درصد دی متیل سولفوکساید، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، دو واحد آنزیم *Taq* پلی مراز، (شرکت سیناژن تهران) دو میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های پاره شده با پتاس به عنوان DNA الگو، و ۲۵ پیکومولار از جفت آغازگر CRO-F: GGTATTGGCGGGGGTGC و COR-R: GGCGCTCCCTCGCACTT (Cuppels & Ainsworth 1995) (ساخته شده توسط شرکت Bionner کره جنوبی) انجام پذیرفت. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی در ۶۷°C به مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در ۷۲°C به مدت دو دقیقه بود. در آخر یک مرحله بسط نهایی قطعات در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، به کار برده شد(Cuppels & Ainsworth 1995). تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Thermo Cyeler, Biometra) انجام شد.

rep-PCR

روش rep-PCR(repetitive extragenic palindromic-PCR) طبق روش‌های توصیه شده (Versalovic *et al.* 1991، Weingart & Volksch 1997)، با اندکی تغییر و با استفاده از آغازگرهای معرفی شده برای REP-PCR، ERIC-PCR وBOXA1R-PCR (ساخته شده توسط شرکت MWG آلمان) انجام شد (Versalovic *et al.* 1991). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر ۱x (۶۷ میلی‌مولار تریس pH ۸/۴ و ۱۶ میلی‌مولارسولفات آمونیم)، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱۰ میلی مولار مرکاپتواتانول، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP، دو واحد آنزیم *Taq* پلی مراز، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر و دو میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های پاره شده با پتاس به عنوان DNA الگو، انجام شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، ۳۴ مرحله شامل واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه (برای ERIC-PCR، زمان ۵۰ ثانیه بود)، اتصال آغازگر به DNA ژنومی برای ERIC-PCR، ۴۵ ثانیه در ۴۸°C، برای BOX-PCR، ۴۰ ثانیه در ۵۰°C و برای REP-PCR، ۴۸ ثانیه در ۴۰°C درجه بود. تکثیر DNA در ۷۲°C به مدت دو دقیقه انجام شد. یک مرحله بسط نهایی نیز در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه به کار گرفته شد.

شرایط انجام الکتروفورز

الکتروفورز محصولات حاصل از PCR، در ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه یک نشانگر وزنی (۲/۱–۰/۱ Kb)، شرکت Bionner کره جنوبی) و در بافر تریس- برات، EDTA (TBE، ۸۹ میلی‌مولار تریس، ۸۹ میلی‌مولار اسید بوریک، دو میلی‌مولار EDTA، ۸/۲ ~ pH) انجام شد. نمونه‌ها (پنج میکرولیتر) پس از اختلاط با پنج میکرولیتر بافر TBE حاوی ۰/۱ درصد برم فنل بلو و ۵۰ درصد گلیسرول در چاهک‌های ژل ریخته شده و الکتروفورز در اختلاف

پتانسیل ۸۰ ولت، تا رسیدن برم فنل بلو به انتهای ژل انجام شد. ژل با اتیدیوم بروماید (محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ آمیزی و 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 و تعیین ضریب تشابه ساده (Simple matching coefficient) صورت گرفت. ماتریس تشابه تشکیل شده و دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی وزن (unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA) با نرم افزار MVSP 3.13 محاسبه و ترسیم گردید (Sneath & Sokal 1973).

نتایج

جداسازی و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی

از کشت نمونه‌های خاکشیر دارای علائم لکه برگی که از حومه پلور جمع‌آوری شده بود، جدایه‌هایی با پرگنه‌های محدب سفید رنگ تا بژ و لعابدار روی محیط NAS به دست آمد. قطر پرگنه‌ها بعد از دو روز در دمای ۲۵ ^{o}C حدود دو میلی‌متر و بعد از سه روز حدود سه میلی‌متر و با حاشیه صاف بود. شانزده جدایه با پرگنه‌های هم شکل که در محیط King`s B (King *et al.* 1954) رنگدانه فلورسانت تولید کردند انتخاب، و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها تعیین شد. جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک، هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند. جدایه‌ها لوان تولید کرده و آربوتین را هیدرولیز نمودند. این جدایه‌ها از آلانین، گلوتامین، گلیسرول و دی- تارتارات استفاده کرده ولی توانایی استفاده از دولسیتول، مالتوز، رامنوز و ال- تارتارات را نداشتند. سایر ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها در جدول یک خلاصه شده است.

بیماری‌زایی

هفت تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، با هر دو روش محلول پاشی و تزریق سوسپانسیون به برگ، در پهنک برگ‌های خاکشیر تلخ (*S. irio*) لکه‌های نکروزه به قطر ۲-۱ میلی‌متر ظاهر شد. این لکه‌ها عمدتاً به وسیله هاله‌ای زرد رنگ احاطه شده بودند (شکل یک). جدایه‌ها علائمی را پس از مایه زنی در گوجه فرنگی، کیسه کشیش، شلغم روغنی، خاکشیر (*S. altisimum*)، کلم پیچ، کلم گل، خردل و منداب ایجاد نکردند. اما لکه‌های آبسوخته که گسترش نسبتا سریعی داشتند بر روی برگ‌های تربچه و ترتیزک مشاهده گردید. در مشاهده میکروسکوپی نیز تراوش جمعیت سلول‌های باکتریایی (ooze)، از حاشیه لکه‌های بریده شده از برگ‌های آلوده، دیده شد. در گیاهان شاهد که تنها با آب مایه‌زنی شده بودند، علائمی ظاهر نگردید. باکتری‌ها، مجدداً از برگ‌های مایه زنی شده خاکشیرتلخ، تربچه و ترتیزک، روی محیط King`s B، جداسازی گردید.

الگوی پروتئین‌های سلولی

مقایسه الگوی پروتئین‌های سلولی مشخص نمود که جدایه‌های بیماری‌زا در خاکشیر، الگوی نسبتاً مشابهی داشته ولی در چندین نوار پروتئینی با جدایه‌های *P. s.* pv. *maculicola* و *P.s.* pv. *tomato* متفاوت بودند. تفاوت زیادی میان الگوی جدایه‌ها با جدایه *P. s.* pv. *syringae* وجود داشت. هم‌چنین جدایه‌های *P. s.* pv. *maculicola* و *P.s.* pv. *tomato*، الگوی

جدول ۱. ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باکتری‌های جداسازی شده از خاکشیر تلخ در مقایسه با پاتووارهای *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* و *P.S.* pv. *tomato*

Table 1. Morphological, biochemical and physiological characteristics of the bacterial strains isolated from *Sisymbrium irio* compared with those of *Pseudomona syringae* pv. *maculicola* and pv. *tomato*

Characteristic	ویژگی	واکنش جدایه‌های خاکشیر reaction of *Sisymbrium irio* bacterial strains[a]	واکنش جدایه‌های استاندارد reaction of standard strains *Pseudomonas syringae* pv.	
			maculicola	*tomato*
Hydrolysis of :	هیدرولیز:			
Esculin	اسکولین	87[b]	+	+
Casein	کازئین	44[b]	+	+
Tyrosin	تایروزین	+	−	−
Tween-80	توئین ۸۰	+	+	+
Gelatin	ژلاتین	+	+	+
Arabutin	آربوتین	+	+	+
Starch	نشاسته	69[b]	+	+
Arginine dihydrolase	هیدرولیز آرژنین	-	-	-
Lecithinase	لستیناز	-	-	-
Oxidase	اکسیداز	-	-	-
Catalase	کاتالاز	+	+	+
Growth on 3% NaCl	رشد در محیط حاوی ۳٪ نمک طعام	81[b]	+	+
Growth on 4% NaCl	رشد در محیط حاوی ۴٪ نمک طعام	6[b]	-	-
Growth on 5% NaCl	رشد در محیط حاوی ۵٪ نمک طعام	-	-	-
Nitrae reduction	احیا نیترات	-	-	-
Urease	اورآز	-	-	-
Production of indole	تولید اندول	-	-	-
MR	متیل رد	-	-	-
VP	استوئین	56[b]	+	+
Potato rot	لهانیدن سیب زمینی	19[b]	-	-
Reducing substances from sucrose	تولید مواد احیا کننده از سوکروز	+	+	+
Action on Litmus milk	اثر بر شیر لیتموس	31[b]A 69[b] KDR	KDR	KDR
Levan formation	تولید لوان	+	+	+
Dnase	دنآز	+	+	+
Tobacco hypersensitivity	فوق حساسیت در توتون	+	+	+

ادامه جدول ۱.

Characteristic	ویژگی	واکنش جدایه‌های خاکشیر reaction of *Sisymbrium irio* bacterial strains[a]	واکنش جدایه‌های استاندارد reaction of standard strains *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*	 *tomato*
Production of Coronatin	تولید کروناتین	40[b]	+	-
Phosphatase activity	فسفاتاز	+	+	-
Acid production from	تولید اسید از:			
Galactose, Sucrose	گالاکتوز، سوکروز	+	+	+
L-Glutamine	ال-گلوتامین	+	+	+
D-Arabitol	د-آرابیتول	+	+	+
D-Xylose	د-زایلوز	+	+	+
D-Mannitol	د-مانیتول	+	+	+
Glycerol, Glucose	گلیسرول، گلوکز	+	+	+
D-Sorbitol	د-سوربیتول	+	+	+
Arabinose	آرابینوز	+	+	+
mayo-Inositol	مایواینوزیتول	+	+	+
Melibiose	ملی بیوز	31[b]	+	-
Fructose	فروکتوز	75[b]	+	+
D-Terhalose	د-ترهالوز	-	-	-
Salicin, Ethanol	سالیسین، اتانول	-	-	-
meso-Erythritol	مزواریتریتول	-	-	-
Adonitol, Dulcitol	آدونیتول، دولسیتول	-	-	-
D-Lactose, Xylitol	د-لاکتوز، زایلیتول	-	-	-
Rhamnose	رامنوز	-	-	-
Raffinose, Maltose	رافینوز، مالتوز	-	-	-
Cellobiose,	سلوبیوز	-	-	-
Utilization of	استفاده از:			
Citrate, Succinate	سیترات، سوکسینات	+	+	+
Oxalate, Benzonate	اگزالات، بنزوات	-	-	-
Malonate	مالونات	+	+	+
Glycine	گلایسین	-	-	-
Valerate, Dextrin	والارات، دکسترین	-	-	-
Galacturonate	گالاکترونات	-	-	-
L-Tartrate	ال-تارتارات	-	-	-
D-Tartrate	د- تارتارات	+	+	+

[a]= ۱۶ جدایه. - = همه جدایه‌ها پاسخ منفی داده‌اند. + = همه جدایه‌ها پاسخ مثبت داده‌اند. b= (درصد جدایه‌هایی که واکنش مثبت داشته‌اند). K= قلیایی. D= هضم. A= اسیدی. R= احیا .

[a] = 16 strains. - = negative results with all strains. + = positive results with all strains. [b] = percentage of strains with positive reaction. K = alkali. D= digest. A= acidic. R= reduction.

شکل ۱. لکه های نکروزه ایجاد شده بر روی برگ های خاکشیر تلخ، ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با جدایه شماره ۱۰.

Fig. 1. Necrotic spots appearing on *Sisymbrium irio* leaves 10 days after inoculation with strain number 10.

پروتئینی نسبتاً مشابهی داشتند و تنها در نوارهای معدودی بین آنها تفاوت وجود داشت (شکل ۲).

بررسی تولید زهرابه کروناتین در محیط کشت

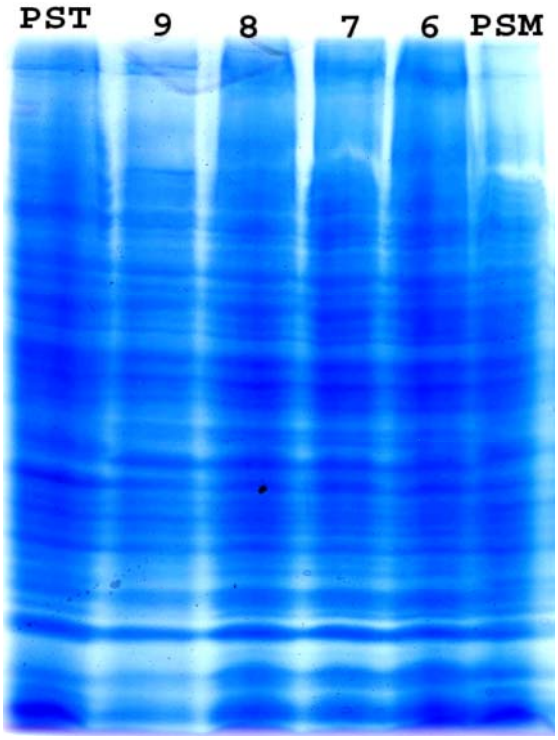
یک هفته پس از آغشته سازی برش‌های سیب زمینی با محیط کشت HSC، در برخی از آنها علائم هیپرتروفی مشاهده گردید. از میان ۱۸ جدایه مورد آزمون تنها پنج جدایه به همراه پاتووار *P. s.* pv. *maculicola*، توانایی ایجاد هیپرتروفی که نشانگر تولید کروناتین است، را نشان دادند.

بررسی حضور ژن مولد کروناتین در جدایه‌ها

در همه جدایه‌ها قطعه ۶۹۰ بازی از ژن *cfl* (Coronafacate ligase) که مسئول بخشی از روند سنتز زهرابه کروناتین است، تکثیر گردید. این قطعه در پاتووارهای *P. s.* pv. *maculicola* و *P. s.* pv. *tomato* نیز تکثیر شد، اما در جدایه *P. s.* pv. *syringae* (به عنوان شاهد منفی)، تکثیر نگردید (شکل ۳).

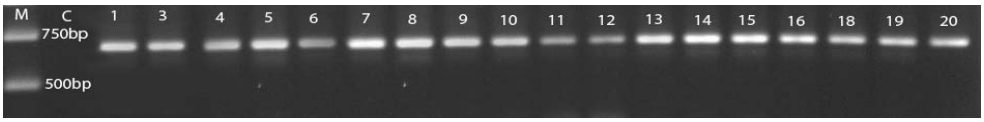
نقوش قطعات تکثیر شده با rep-PCR

نقوش تکرار پذیری از قطعات DNA تکثیر شده در تمامی جدایه‌ها به دست آمد. مقایسه الگوهای به دست آمده نشان داد که میان جدایه‌ها تفاوت زیادی وجود نداشته اما از دو جدایه استاندارد متمایز هستند. الگوی نقوش به دست آمده با آغازگر REP-PCR نشان داد که جدایه‌های خاکشیر بیش از ۹۰ درصد به یکدیگر شباهت داشته و در سطح ۱۲ درصد تشابه از پاتووارهای استاندارد متمایز شدند. در ERIC-PCR جدایه‌های خاکشیر در سطح تشابه ۷۲ درصد یک گروه را تشکیل دادند و در BOX-PCR تشابه بین جدایه‌های خاکشیر ۵۲ درصد بود. در نقوش به دست آمده با هر سه روش rep-PCR در سطح ۷۵ درصد تشابه، جدایه‌های خاکشیر در یک خوشه (کلاستر) قرار گرفتند و شباهت جدایه‌های خاکشیر با جدایه استاندارد *P. s.* pv. *maculicola* و *P. s.* pv. *tomato*، ۲۰ درصد برآورد گردید (شکل ۴). از میان سه روش به کار گرفته شده، BOX-PCR توان بیشتری در انعکاس تفاوت‌های موجود بین پاتووارها را داشت (شکل ۵).



شکل ۲. الگوی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها در ژل پلی اکریلامید. شماره‌های ۶ تا ۹ جدایه‌های خاکشیر (Psm) *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*، و *Pseudomonas syringae*. pv. *tomato* (Pst) می‌باشد.

Fig.2 . Polyaciylamide gel electrophoretic protein profiles of strains inciting *Sisymbrium irio* leaf spot (Lanes 6-9) and *Pseudomonas syringae* pv *maculicola*(lane Psm) and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Lane Pst)

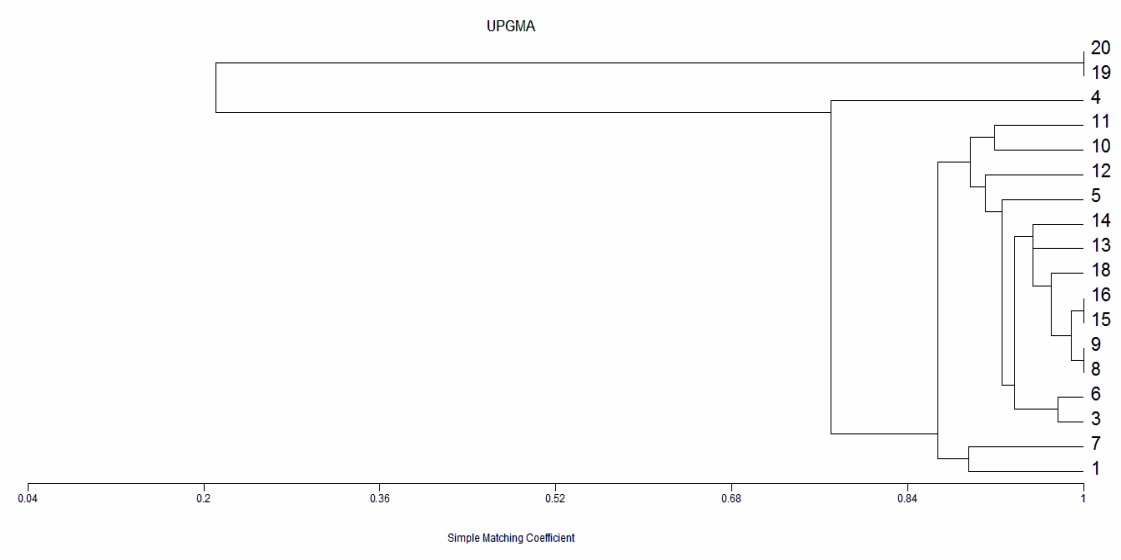


شکل ۳. قطعه ۶۹۰ بازی تکثیر شده از ژن مولد کروناتین در ژل اگاروزی ۱ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. .شماره های ۱ تا هجده جدایه‌های خاکشیر و شماره نوزده و بیست به ترتیب جدایه‌ای *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* و *Pseudomonas syringae* pv. tomato می باشد. C کنترل منفی وM نشانگر جرم مولکولی است.

Fig. 3. The 690 bp fragment from the coronatine gene in 1 % agarose gel stained with etidium bromide. *Sisymbrium* isolates(Lane 1 to 18). *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (lane 19) and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (lane 20). C: water for DNA template(Negative control). M: 1500-bp DNA ladder.

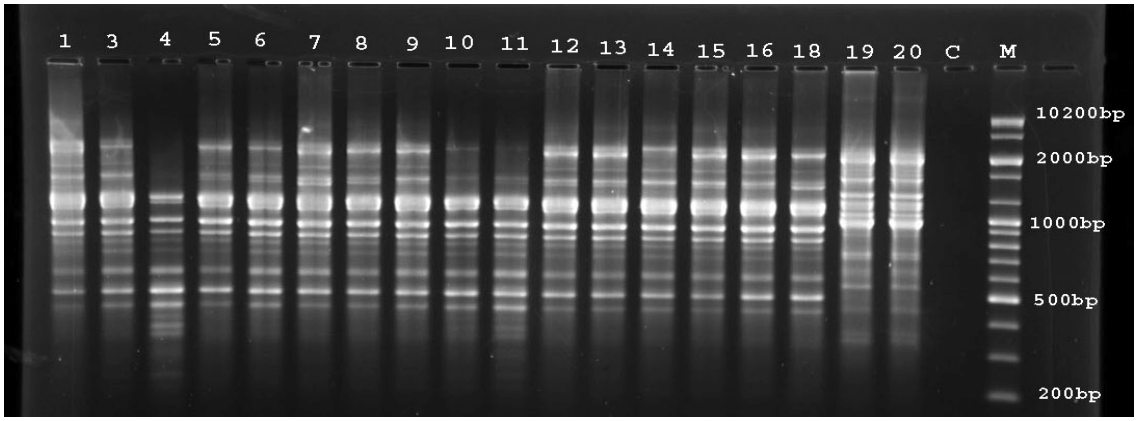
بحث

لکه برگی باکتریایی خاکشیر در چند سال متوالی، در منطقه پلور استان تهران دیده شد و باکتری جدا شده از برگ‌های این گیاه پس از بررسی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پاتوواری از گونه *P. syringae* تشخیص داده شد (Palleroni *et al.* 1973 و Schaad *et al.* 2001). بر اساس ویژگی‌های دامنه منابع کربنی مورد استفاده، از جمله تارتارات، لاکتات و اریتریتول و ایجاد بیماری در خاکشیر تلخ، باکتری عامل مشابه با *P. s.* pv. *maculicola* مشخص گردید (Young & Triggs 1994 ,Schaad *et al.* 2001, Bradbury 1986). شناسایی و طبقه‌بندی باکتری *P. s.* pv. maculicola به سبب شباهت آن به پاتووار



شکل ۴. دندروگرام ترکیبی الگوی اثر انگشتی جدایه‌های به دست آمده از خاکشیر در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP-PCR, ERIC-PCR و BOX-PCR. شماره‌های ۱ تا هجده جدایه‌های خاکشیر و شماره‌های نوزده و بیست به ترتیب جدایه‌ای *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* و *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* می‌باشد.

Fig.4. Dendrogram obtained by comparison of strains isolated from *Sisymbrium irio* (lanes 1 to 18 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (lane 19) and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(lane 20).



شکل۵. نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه‌ها با BOX- PCR شماره‌های ۱ تا هجده جدایه‌های خاکشیر و شماره‌های نوزده و بیست به ترتیب جدایه‌ای *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* و *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* می‌باشد. C کنترل منفی و M نشانگر جرم مولکولی ۱۰۰ بازی می‌باشد.

Fig. 5. BOX – PCR fingerprint of bacterial strains isolated from *Sisymbrium irio*(lanes 1-18) and those of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*(lane-19) and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(lane 20). C: water for DNA template(Negative control). M: 100-bp DNA ladder.

P. s. pv. tomato همواره مشکل بوده است. تشابه دو پاتووار در طیف منابع کربنی مورد استفاده و دامنه بیماری‌زایی می‌باشد (Zhao *et al.* 2000, Bradbury 1986, Schaad *et al.* 2001). در بررسی اخیر تفاوت قابل ملاحظه‌ای در ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی این دو پاتووار مشاهده نگردید. جدایه‌های خاکشیر از پاتووار

P. s. pv. *maculicola* در ویژگی‌هایی مانند اثر بر شیر لیتموس، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، هیدرولیز نشاسته و استفاده از برخی از منابع کربنی مانند ملی بیوز و فروکتوز قابل تمایز بود. از نظر بیماری‌زایی جدایه‌های خاکشیر دارای دامنه میزبانی محدودی هستند و از این نظر تفاوت قابل ملاحظه‌ای با پاتووار *P. s.* pv. *maculicola* دارند. توجه به نوع علائم و دامنه میزبانی برای شناسایی و تمایز پاتووارها، به عنوان معیار اصلی در تمایز پاتووارها مطرح و مورد استفاده است (Dye *et al.* 1980). تولید کروناتین از مواردی است که در مطالعات دیگران به عنوان یکی از ویژگی‌های این پاتووار و برخی دیگر از اعضای گونه ژنومی سه در نظر گرفته شده است (Zhao *et al.* 2000). این زهرابه به عنوان فاکتور مهم پرآزاری دو پاتووار *P. s.* pv. *tomato* و *P. s.* pv. *maculicola* محسوب شده (Bender *et al.* 1987) و احتمالاً در پرآزاری پاتووار *P. s.* pv. *atropurpurea* نیز دخالت دارد (Sato *et al.* 1983). در زیست‌سنجی تولید کروناتین برخی از جدایه‌ها با تولید این زهرابه در برش‌های سیب زمینی هیپرتروفی ایجاد نمودند. ارتباط مشخصی میان جدایه‌های مولد لکه‌های نکروزه با هاله زرد رنگ در خاکشیر و جدایه‌های مولد زهرابه در محیط مصنوعی، دیده نشد. تکثیر ژن *cfl* نشان داد که کلیه جدایه‌ها احتمالاً دارای توان تولید زهرابه هستند و عدم تولید هیپرتروفی در سیب زمینی توسط برخی از جدایه‌ها می‌تواند با شرایط کشت و نگهداری و عوامل متغییر محیطی و یا ژنتیکی جدایه‌ها ارتباط داشته باشد. استفاده از آغازگرهای اختصاصی با توجه به سهولت کار، حساسیت بالا و سرعت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) به عنوان روش توصیه شده‌ای در شناسایی این دسته از پاتووارها، مورد توجه قرار گرفته است (Weingart & Volksch 1997). ردیابی ژن‌های دخیل در تولید زهرابه به عنوان یکی از روش‌های شناسایی باکتری‌های دیگری مانند *P. s.* pv. *phaseolicola* نیز، کارآئی بالایی دارد (Prosen *et al.* 1993). با توجه به عدم امکان شناسایی دقیق پاتووارهای *P. syringae* بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و مشابه بودن دست کم چند پاتووار از نظر این خصوصیات (Young & Triggs 1994، Gardan *et al* 1999)، شناسایی جدایه‌ها مولد لکه برگی خاکشیر عمدتاً بر پایه بیماری‌زایی و ردیابی ژن دخیل در تولید کروناتین صورت پذیرفت. پاتووار *P. s.* pv. *maculicola* دارای دامنه میزبانی نسبتاً وسیعی در تیره شب بو بوده و علاوه بر ایجاد لکه برگی در گونه‌ها و واریته‌های تیره کلم در گوجه فرنگی نیز بیماری‌زاست (Wiebe & Campbell 1993, Cuppels & Ainsworth 1995, Zhao *et al.* 2000). عدم بیماری‌زایی جدایه‌های خاکشیر روی دو رقم کلم در آزمایش‌های قبلی محرز گردید (Arabi *et al.* 2002) و در این بررسی مشخص شد که تعداد دیگری از گونه‌های خانواده چلیپائیان، به این جدایه‌ها حساس نیستند. با توجه به دامنه میزبانی محدود جدایه‌های عامل لکه برگی در خاکشیر تفاوت میان آنها و پاتووارهای *P. s.* pv. *tomato* و *P. s.* pv. *maculicola* را می‌توان قابل توجه دانست. جدایه‌های عامل لکه برگی در خاکشیر دارای الگوی پروتئینی با تشابه بالا با یکدیگر بوده ولی در نوارهای پروتئینی متعددی با جدایه‌های استاندارد تفاوت داشتند. الگوی پروتئین‌های سلولی باکتری‌ها منعکس کننده محتوی ژنتیکی آنها بوده و به عنوان ابزاری قابل اعتماد در شناسایی و طبقه‌بندی آنها به ویژه در سطح زیرگونه به شمار آمده است (Vandamme *et al.* 1996, Li & Hayward 1994, Prakash *et al.* 2007,

(Keresters & Deley 1975). با توجه به عدم بیماری‌زایی جدایه‌های خاکشیر روی کلم و تعدادی دیگر از گونه‌ها و زیر گونه‌های خانواده کلم که به عنوان میزبان‌های طبیعی و مهم *P. s.* pv. *maculicola* مطرح هستند (Wiebe & Campbell 1993, Cuppels & Ainsworth 1995, Zhao *et al.* 2000)، شباهت جدایه‌های به دست آمده از خاکشیر با جدایه استاندارد در انگشت‌نگاری ژنتیکی rep-PCR که به عنوان ابزاری مفید برای شناسایی و تعیین روابط تاکسونومیکی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله پاتووارهای *P. syringae* مطرح است، تعیین گردید (Vincente & Steven 2007, Louws *et al.* 1994; Rademaker *et al.*1998. Weingart & Volksch 1997). انگشت نگاری با استفاده از روش rep-PCR و ترکیب دندروگرام حاصل، نشان داد که جدایه‌های خاکشیر از *P. s.* pv. *maculicola* و *P. s.* pv. *tomato* از همدیگر متمایز هستند. لکه برگی باکتریایی خاکشیر تلخ، تاکنون تنها در ایران و در منطقه پلور استان تهران دیده شده است. میزبان این باکتری در شرایط طبیعی، خاکشیر تلخ است که گونه‌ای علف هرز محسوب می شود ولی این جدایه‌ها در شرایط گلخانه در تربچه و ترتیزک نیز بیماری‌زا هستند. با توجه به ویژگی‌های ارائه شده احتمال می‌رود، جدایه‌های به دست آمده از خاکشیر وحشی، متعلق به پاتووار توصیف نشده‌ای از *P. syringae* باشد که تعیین موقعیت دقیق تاکسونومیکی آن مستلزم انجام آزمون‌های ژنوتیپی مانند تعیین توالی برخی از نواحی ژنوم و بررسی میزان همولوژی DNA با جدایه‌های استاندارد است. در حال حاضر براساس مجموع ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی و ژنوتیپی می‌توان باکتری ایجاد کننده لکه برگی در خاکشیر وحشی را، به عنوان جدایه‌های غیر عادی یا دارای دامنه میزبانی محدود *P. s.* pv. *maculicola* معرفی نمود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (67-65) متن انگلیسی مراجعه شود.