

## تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *Agrobacterium tumefaciens* و *A. vitis* از میزبان‌های مختلف در برخی از استان‌های غربی و جنوبی ایران با استفاده از نشانگر RAPD\*

حمزه مفاخری<sup>۱</sup>، سیدمحسن تقوی<sup>۱\*</sup>، ضیال‌الدین بنی‌هاشمی<sup>۱</sup> و علی نیازی<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۳)

### چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های *Agrobacterium tumefaciens* و *A. vitis* در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ از باغ‌های مو، گلخانه‌های پرورش گل رز و مزارع چغندر قند در استان جنوبی (فارس)، جنوب غربی (کهگیلویه و بویراحمد) و غربی (کردستان و کرمانشاه)، از گیاهان دارای علائم گال طوقه و ریشه نمونه برداری صورت گرفت. بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، آزمون‌های بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و همچنین با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس (*virD2A/virD2C*) و اختصاصی در سطح گونه (*VCF/VCR* و *PGF/PGR*) بیمارگر به عنوان *A. vitis* و *A. tumefaciens* شناسایی شد. علاوه بر این با استفاده از جفت آغازگرهای *VisF/VisR* و *VisFF1/R2* نوع اوپین جدایه‌های *A. vitis* تشخیص داده شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های دو گونه *A. vitis* و *A. tumefaciens* در آزمون چندشکلی تصادفی قطعات تکثیر شده‌ی دی‌ان‌ای (RAPD) از ۱۱ آغازگر تصادفی استفاده شد. در گونه *A. tumefaciens* جدایه‌های متعلق به میزبان‌های مختلف در سطح تشابه ۷۳ درصد به سه گروه و جدایه‌های *A. vitis* به دو گروه تقسیم شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های متعلق به دو گونه *A. vitis* و *A. tumefaciens* دارای تنوع زیادی بودند و جدایه‌های به دست آمده از یک منطقه جغرافیایی در چند گروه مختلف قرار گرفتند. همچنین بین تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی و منطقه جغرافیایی یا میزبان آن‌ها ارتباطی وجود نداشت. با استفاده از آغازگرهای *VisF/VisR* و *VisFF1/R2* مشخص شد که ۵۷/۹ درصد از جدایه‌های *A. vitis* دارای ژن کد کننده ویتوپین، ۲۶/۳ درصد از جدایه‌های ژن کد کننده اوپین اکتوپین / نوپالین بودند و ۱۵/۸ درصد جدایه‌ها قادر به تکثیر هیچ یک از قطعات ذکر شده نبودند.

کلیدواژه: گال طوقه، پلاسمید Ti، نشانگر مولکولی

\* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [mtaghavi@shirazu.ac.ir](mailto:mtaghavi@shirazu.ac.ir)

۱. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، استاد استاد بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

## Genotypic Diversity among *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* Isolates From Different hosts in Some of Western and Southern Provinces of Iran using RAPD Marker\*

H. Mafakheri<sup>1</sup>, S. M. Taghavi<sup>1\*\*</sup>, Z. Banihashemi<sup>1</sup>, and A. Niazi<sup>2</sup>

(Received: 8.8.2016; Accepted: 14.9.2017)

### Abstract

To assess the genetic diversity of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis*, during 2013 and 2014, samples of grapevine, rose and sugar beet with gall symptoms on crown and roots were collected from different areas of southern (Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad) and western (Kurdistan and Kermanshah) provinces of Iran. Based on phenotypic characteristics, biochemical and pathogenicity tests as well as using the generic primers virD2A/virD2C the isolates were identified as *Agrobacterium*. Furthermore, species-specific primer pairs VCF/VCR for *A. tumefaciens*, as well as PGF/PGR for *A. vitis* were used to determine the identity of the causal agent. For detection of opine type among *A. vitis* isolates, a PCR assay was carried out using primer pairs VisF/VisR and VisFF1/R2. Genetic diversity of *A. tumefaciens* and *A. vitis* isolates were investigated by random amplified polymorphic DNA technique using 11 random primers. The *A. tumefaciens* isolates clustered in three groups at 73% level of similarity and *A. vitis* clustered in two groups. Based on the results, *A. tumefaciens* and *A. vitis* isolates showed high genetic diversity even in a same geographical region. In conclusion, no correlation was observed between genetic diversity and geographical origins or their host plants. For detection of opine genes among *A. vitis* isolates, a PCR assay was carried out using primer pairs VisF/VisR and VisFF1/R2. Our results revealed that 57.9% of *A. vitis* isolates produced vitopine and 26.3% of them produced octopine or nopaline, whereas 15.8% of isolates were unable to amplify specific fragment.

**Keywords:** Crown gall, Ti plasmid, Molecular marker

---

\* A Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to School of Agric., Shiraz University., Shiraz, Iran.

\*\*Corresponding author's E-mail: mtaghavi@shirazu.ac.ir

1. Former M.Sc. Student, Prof and Prof of Plant Pathol., respectively, School of Agric., Shiraz University., Shiraz, Iran.
2. Associate Prof. of Institute of Biotechnology, School of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

## مقدمه

ناهمگنی در بیوارا سبب شد که این بیوار به‌عنوان یک گونه کمپلکس و شامل ۱۱ گونه ژنومی معرفی شود. در حال حاضر چهار گونه ژنومی اسم گونه دریافت کرده اند که گونه ژنومی ۴ این گونه کمپلکس شامل جدایه‌های *A. tumefaciens* و *radiobacter* می‌باشد (Lindstrom & Young 2011).

اولین گزارش از بیماری سرطان طوقه در ایران مربوط به سال ۱۳۳۷ از تاکستان‌های ارومیه است و سپس در سال ۱۳۴۵ عامل بیماری از درختان انگور در منطقه بوئین‌زهرای قزوین به عنوان *A. tumefaciens* شناسایی شد (Amani 1966). در بررسی‌های انجام شده *Agrobacterium* بیوار ۱ و ۳ به عنوان عامل گال طوقه مو در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Ale-Yasin & Banihashemi 1993) و آذربایجان غربی (Irani Fatehi et al. 2004) و کرج و تاکستان (Ghasemi et al. 1998) معرفی شد. در سال‌های اخیر *Agrobacterium* از سیب، گیلاس، شلیل، آلو، هلو، فیکوس بنجامین، چغندر قند، سرو و گردو از ایران گزارش شده است (Marefat & Hassanzadeh Taghavi and Golkhandan 1998, Salehi, Niknezhad Kazempour et al. 2005, 2007, Rouhrazi & Rahimian 2014, et al. 2003).

تنوع جمعیت آگروباکتریوم از جنبه‌های مختلف مانند تنوع ژنوم، تنوع پلاسمید و یا تنوع دامنه میزبانی مورد بررسی قرار گرفته است (shams et al., 2012). جهت بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مختلف از قبیل RAPD، PCR-RFLP و rep-PCR استفاده شده است (Irelan & Meredith 1996, Puławska & Kałużna, 2011, Momol et al. 1998, Llop et al. 2003, Kawaguchi et al., 2008) که نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد، جمعیت‌های آگروباکتریوم بسیار ناهمگن هستند و تنوع بالایی در بین جمعیت‌های آن‌ها مشاهده شده است.

آگروباکتریوم به‌عنوان یک باکتری خاک‌زاد دارای پراکنش بسیار وسیعی است و در زمین‌های بکر و فاقد کشت نیز یافت شده است و تهدید جدی برای احداث باغ و نهالستان‌ها در مکان‌های جدید می‌باشد (Pulawska, 2010). گونه‌های *Agrobacterium* سبب ایجاد گال طوقه در طیف وسیعی از گیاهان دانه‌دار، هسته‌دار، زینتی و زراعی (شامل ۶۴۳ گونه گیاهی متعلق به ۳۳۱ جنس و ۹۳ خانواده) می‌شوند (De Cleene & De Ley, 1976). در سال‌های اخیر، گال طوقه به یک بیماری مهم باکتریایی در نهالستان‌ها، مزارع و باغ‌ها تبدیل شده و زیان‌های اقتصادی گسترده‌ای را به این محصولات وارد می‌کند (Tzfira & Citovsky, 2008) طبقه‌بندی و نام‌گذاری گونه‌های آگروباکتریوم بر اساس علائم گال، سبب‌شناسی و ژنتیک بیماری‌زایی صورت گرفته است. این جنس بر پایه آزمون‌های بیوشیمیایی به سه بیوار تقسیم شد. در سال ۲۰۰۱ یانگ و همکاران بر اساس توالی 16S rRNA پیشنهاد تغییر نام *Agrobacterium* به *Rhizobium* را مطرح کردند، همچنین پیشنهاد تغییر گونه *A. tumefaciens* به *R. radiobacter* نیز ارائه شد (Young et al. 2004). اگرچه این پیشنهادها چندان مورد قبول واقع نشد. بر اساس گزارش کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی پروکاریوت‌ها (ICSP<sup>1</sup>) در سال ۲۰۱۱ گونه‌های *A. larrymoorei*، *A. rubi*، *A. vitis* به‌عنوان سه گونه همگن مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین بیوار ۲ به‌عنوان *Rhizobium rhizogenes* نام‌گذاری شد، درحالی‌که

1. International Committee on Systematics of Prokaryotes

تصادفی RAPD و تعیین نوع اوپین‌های تولید شده در جدایه‌های *A. vitis* با به‌کارگیری آغازگرهای اختصاصی صورت گرفته است. مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌های دارای علائم گال طوقه از میزبان‌های مختلف شامل انگور، گل رز و چغندر قند در تابستان و پاییز سال ۱۳۹۳ از استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان و کرمانشاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. گال‌ها پس از شست‌وشو با آب معمولی به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۰/۵٪ ضد عفونی و سپس توسط آب مقطر سترون شسته شدند. گال‌های ضد عفونی شده در هاون سترون حاوی چند قطره آب مقطر سترون کاملاً له و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در شرایط سترون از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت‌های نیمه انتخابی (RS) Roy & Sasser و 1A کشت خطی انجام شد و تشک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۳ تا ۴ روز پرگنه‌های شبیه *Agrobacterium* (پرگنه قرمز با حاشیه سفید روی محیط کشت RS و پرگنه با مرکز قهوه‌ای و حاشیه سفید روی محیط کشت 1A) به محیط کشت Nutrient Agar (NA) منتقل شدند و جهت انجام آزمون‌های تشخیصی در مراحل بعدی باکتری‌ها در آب مقطر سترون در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Moore et al. 2001).

### آزمون‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی جدایه‌ها

به‌منظور شناسایی جدایه‌ها آزمون‌های استاندارد تشخیصی و افتراقی این جنس شامل تولید ۳-کتولاکتوز، رشد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و غلظت نمک دو درصد، تولید قلیا از مالونیک اسید و اسید تارتاریک،

این میزان تنوع بالا نه تنها در مناطق جغرافیایی گسترده بلکه در داخل یک نهالستان و حتی در درون یک گال نیز گزارش شده است (Puławska, 2010).

باکتری‌های موجود در یک منطقه و نهالستان از نظر تولید اوپین متفاوت می‌باشند (Szegedi et al., 2003). با توجه به اینکه ژن‌های کد کننده سنتز اوپین بر روی پلاسمید قرار دارد و نوع اوپین‌های تولید شده به نوع Ti پلاسمید بستگی دارد، بنابراین با شناسایی نوع اوپین‌های تولید شده در یک منطقه می‌توان جمعیت‌های آگروباکتریوم را از نظر تنوع Ti پلاسمید مورد بررسی قرارداد (Moore 1997, et al.,). همچنین در کنترل بیولوژیک بیماری گال طوقه توسط گونه‌های *A. radiobacter* شناخت نوع اوپین‌های تولید شده جدایه‌های بیماری‌زای آگروباکتریوم بسیار مهم می‌باشد (Tzfira & Citovsky, 2008).

شناسایی و بررسی میزان تنوع ژنوتیپی و تعیین نوع اوپین‌های تولید شده در بین جمعیت‌های آگروباکتریوم، اطلاعات بسیار ارزشمندی در رابطه با تحقیقات اپیدمیولوژی و در نهایت مدیریت بیماری به ما می‌دهد، زیرا با پیدا کردن جدایه‌های مشابه در مناطق مختلف جغرافیایی و میزبان‌های مختلف، می‌توان جمعیت‌های باکتری دخیل در اپیدمی و گسترش این بیماری را شناسایی کرد. از طرف دیگر با توجه به ناهمگنی جمعیت باکتری انتخاب برخی از جدایه‌ها به‌عنوان نماینده به‌منظور بررسی میزان کارایی روش‌های مهار زیستی توسط گونه‌های *A. radiobacter* مورد توجه می‌باشد.

با در نظر گرفتن پراکنش و گستردگی این بیمارگر و خسارت اقتصادی آن بر روی میزبان‌های مختلف در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان و کرمانشاه این پژوهش با هدف بررسی میزان تنوع جدایه‌های آگروباکتریوم در این استان‌ها با استفاده از آغازگرهای

دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و سپس محلول رویی را برداشته و به عنوان DNA الگو جهت انجام آزمون‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (Rademaker and de Bruijn, 1997).

برای تشخیص مولکولی جدایه‌ها در سطح جنس از آغازگرهای virD2A/virD2C استفاده شد (Haas et al. 1995). علاوه بر این، جفت آغازگرهای اختصاصی VCF/ VCR و PGF/PGR به ترتیب جهت تشخیص گونه‌های *A. tumefaciens* و *A. vitis* مورد استفاده قرار گرفتند (Sawada et al. 1995, Szegedi & Bottka 2002). توالی آغازگرها و دمای اتصال آن‌ها در جدول ۱ آمده است. جدایه‌های استاندارد (ICMP 5856) *A. radiobacter*، گونه کمپلکس *A. tumefaciens* (C58)، (*K599* / *A. vitis* (ICMP) و *A. rhizogenes* (NCPPB2659) (10752) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

#### تعیین نوع اوپین جدایه‌های *A. vitis*

در بین جدایه‌های *A. vitis* جهت تشخیص ژن مؤثر در سنتز ویتوپین از آغازگرهای VisF/VisR استفاده شد. همچنین برای ردیابی ژن‌های سنتز کننده اکتوپین و نوپالین آغازگرهای VisFF1/R2 به کار گرفته شد. (Bini et al. 2008, Szegedi & Bottka 2002) (جدول ۱).

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، از Master Mix (Ampliqon A/S, Odense, Denmark) استفاده شد. هر واکنش ۲۵ میکرو لیتری PCR شامل ۲ میکرو لیتر DNA و ۱ میکرو لیتر از هر آغازگر (10<sup>-1</sup> pmol×μL) و ۱۰ میکرو لیتر Master Mix و ۱۱ میکرو لیتر آب مقطر سترون بود. چرخه دمایی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه

واکنش اکسیداز، کاتالاز، واکنش قلیایی در شیر لیتاموس و مصرف سیترات انجام شد (Moore et al. 2001).

#### آزمون بیماری‌زایی

به منظور بررسی توانایی جدایه‌ها در ایجاد گال، سوسپانسیونی (OD<sub>600nm</sub>=۰.۱) از کشت ۲۴ ساعته باکتری تهیه و به مقدار ۲۰ میکرو لیتر به محل زخم‌های ایجاد شده توسط اسکالپل سترون در ساقه گیاهان جوان گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* cv. Sunseed) و آفتابگردان (*Helianthus annuus* cv. 6189) مایه‌زنی شد. به منظور حفظ رطوبت، ناحیه مایه‌زنی شده به مدت دو روز با پارافیلیم پوشانده شد. گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و بعد از ۳ تا ۴ هفته گیاهان از لحاظ بروز علائم مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون بیماری‌زایی باکتری بر روی ورقه‌های هوپج نیز انجام شد. ورقه‌های هوپج در تشتک‌های سترون حاوی کاغذ صافی مرطوب با آب مقطر سترون قرار داده شد و مقداری از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری روی لایه مریستمی آن مایه‌زنی شد. تشتک‌ها به مدت دو هفته در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری و سطح ورقه‌ها از لحاظ تشکیل کالوس مورد بررسی قرار گرفت (Schaad et al. 1988).

#### آزمون PCR

استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش لیز قلیایی (alkaline lysis) انجام شد. برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری روی محیط آگار غذایی سوسپانسیونی (OD<sub>600nm</sub>=۰.۲) در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از آن با ۱۰۰ میکرو لیتر هیدروکسید پتاسیم ۰.۰۵ مولار مخلوط و به مدت ۱۵

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR جهت تشخیص مولکولی جدایه‌های *Agrobacterium*Table 1. Primers used for molecular identification of *Agrobacterium* strains.

آغازگر (primer)	توالی (Sequence)	ناحیه هدف Target region	طول قطعه تکثیری (جفت) باز Product size (bp)	دمای اتصال Annealing temperature	منبع Reference
<b>VirD2A</b>	5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3'	<i>virD2</i> gene of <i>A. tumefaciens</i> and <i>A. rhizogenes</i>	221	54	Haas <i>et al.</i> 1995
<b>VirD2C</b>	5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3'				
<b>VCF</b>	5'-ATCATTGTAGCGACT-3'	<i>vir C</i> gene of <i>A. tumefaciens</i>	730	54	Sawada <i>et al.</i> 1995
<b>VCR</b>	5'-AGCTCAAACCTG CTTC-3'				
<b>PGF</b>	5'-GGGGCAGGATGCGTTTTTGGAG-3'	Polygalacturonase gene of <i>A. vitis</i> CG49 (accession number: U73161)	466	54	Szegedi and Bottka 2002
<b>PGR</b>	5'-GACGGCACTGGGGCTAAGGAT-3'				
<b>VisF</b>	5'-CCG GCC ACT TCT GCT ATC TGA-3'	vitopine synthase gene of <i>A. vitis</i> vitopine Ti plasmid	561	54	Szegedi and Bottka 2002
<b>VisR</b>	5'-CCA TTCACC CGT TGC TGT TATT-3'				
<b>VirFF1</b>	5'-ATG AGA AAT TCG AGT TTG CATGATG-3'	<i>virF</i> <i>A. vitis</i> Octopine and nopaline pTi	382	60	Bini <i>et al.</i> , 2008
<b>VirFR2</b>	5'-TCG TGA TGG GTA TAC GCT ACG-3'				

*A. vitis* (ICMP و *A. rhizogenes* (NCPB2659 / 10752) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. یازده آغازگر تصادفی برای مطالعه اولیه مورد آزمایش قرار گرفتند که هفت آغازگر تصادفی (جدول ۲) قادر به تولید باندهای با تعداد و کیفیت مناسب بودند. این آزمون در حجم ۲۵ میکرو لیتری انجام شد که شامل یک میکرو لیتر آغازگر تصادفی ( $10 \text{ pmol} \times \mu\text{L}^{-1}$ )، دو میکرو لیتر DNA، ۱۰ میکرو لیتر Master Mix و ۱۲ میکرو لیتر آب مقطر سترون بود. آزمون RAPD با برنامه دمایی ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگرهای تصادفی در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در زمان یک دقیقه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس

سپس ۳۰ چرخه به صورت واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

#### تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش RAPD

بیست و دو جدایه *A. tumefaciens* از میزبان‌های رز، چغندر قند و انگور و همچنین ۱۹ جدایه *A. vitis* از انگور که با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شده بودند، جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین گونه‌ایی با استفاده از آزمون RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌های استاندارد (ICMP *A. radiobacter* (5856)، گونه کمپلکس (*A. tumefaciens*(C58)، K599)

Simple matching و ضریب تشابه using Arithmetic استفاده شده.

### معیارهای سودمندی نشانگرها

جهت تعیین مناسب‌ترین آغازگر جهت تفکیک بین جدایه‌ها معیارهای محتوی اطلاعات چندشکلی<sup>۲</sup> (PIC)، احتمال همسانی<sup>۳</sup> (PI) و قدرت تفکیک<sup>۴</sup> (DP) به‌طور جداگانه برای هر آغازگر بر اساس فرمول‌ها محاسبه شد. (Xu et al. 2004).

$$PIC = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k P_i P_j (1 - P_i P_j)$$

$P_i$  بیانگر فراوانی آلل  $i$ ام،  $P_j$  بیانگر فراوانی آلل  $j$ ام و  $k$  بیانگر تعداد آلل است (Xu et al. 2004).

$$Dp = 1 - PI$$

$$PI = \sum_i P_i^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n (2P_i P_j)^2$$

$P_i$  بیانگر فراوانی آلل  $i$ ام،  $P_j$  بیانگر فراوانی آلل  $j$ ام و  $n$  بیانگر تعداد آلل است (Xu et al. 2004).

## نتایج و بحث

### جداسازی

پس از کشت سوسپانسیون حاصل از گال گیاهان مو، گل رز و چغندر قند روی محیط کشت‌های نیمه انتخابی 1A و RS، پرگنه‌های شبیه *Agrobacterium* پس از ۲ تا ۵ روز از روی محیط‌های ذکر شده انتخاب و روی محیط NA خالص‌سازی شدند. نمونه‌های مربوط به گال مو روی محیط RS پرگنه‌های با حاشیه سفید و مرکز قرمز

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Random amplified polymorphic DNA  
Table 2. Primers used for random amplified polymorphic DNA

منبع	3'-5' توالی	آغازگر
Reference	Sequence (5'-3')	Primer
R13	GGACGACAAG	Momol et al., 1998
A10	GTGATCGCAG	
A9	GGGTAACGCC	
OPE-2	GGTGCGGGAA	Lop et al., 2003
OPE-7	AGATGCAGCC	
OPE-14	TGCGGCTGAG	
OPE-20	AACGGTGACC	
OPB-18	CCACAGCAGT	Maki-valkama &
OPB- O7	GGTGACGCAG	Karjalainen, 1994
OPB- O8	GTCCACACGG	
OPB- 11	GTAGACCCGT	

گسترش نهایی رشته‌های DNA صورت گرفت. به‌منظور بررسی تکرارپذیری تکثیر باندها توسط آغازگرهای تصادفی، این آزمون برای هر آغازگر دو بار تکرار شد. به‌منظور بررسی الگوی باندها، محصولات PCR حاصل از آغازگرهای تصادفی در آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

### واکاوی داده‌های ژنوتیپی

نقوش الکتروفورزی حاصل از تجزیه RAPD بر اساس وجود یا فقدان باند خاص در نمونه‌ها به‌صورت صفر یا یک نمره دهی شد که عدد صفر بیانگر عدم وجود باندهای مشترک (عدم تشابه ژنتیکی) و عدد یک بیانگر الگوهای باندهای یکسان (تشابه ژنتیکی) است. برای افزایش دقت برای هر آغازگر سه بار نمره دهی تکرار شد. سپس با استفاده از نرم افزار (Ntsys-pc version 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها بررسی شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش سلسله مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان خوشه‌ها از روش Unweight Pair-Group Method (UPGMA) روش

<sup>۲</sup>- Polymorphic Information Content

<sup>۳</sup>- Probability Identity

<sup>۴</sup>- Discriminating power

ایجاد کردند. نمونه‌های مربوط به گال‌های رز و چغندر قند ظاهر شدند. مشخصات ۵۶ جدایه‌ی بررسی شده در این به همراه تعدادی از جدایه‌های مربوط به گال مو روی محیط IA به صورت پرگنه‌های قهوه‌ای با حاشیه سفید پژوهش، در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳ - مشخصات جدایه‌های *Agrobacterium* جدا شده از میزبان‌های مو، گل رز، چغندر قند در تابستان و پاییز سال ۱۳۹۳ در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان و کرمانشاه

**Table 3. Characteristics of *Agrobacterium* strains, isolated from grapevine, rose and sugar beet during the summer and fall of 2014 in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad, Kurdistan and Kermanshah provinces**

<i>Agrobacterium</i> Species	محل جمع آوری Source	میزبان Natural Host	کد جدایه Isolates	تکثیر قطعه مورد نظر Amplification of target sequence using primer pair:				
				VirD2A/ VirD2C	VCF/ VCR	PGF/ PGR	VisF/ VisR	VirFF1/ VirFR2
				+	-	+	+	-
<i>A. vitis</i>	سریش آباد (Serish abad)	تاک (grapevin)	KS1 تا KS5	+	-	+	+	-
<i>A. vitis</i>	قروه (Qorveh)	تاک (grapevin)	KG1	+	-	+	-	-
<i>A. vitis</i>	قروه (Qorveh)	تاک (grapevin)	KG2	+	-	+	-	-
<i>A. vitis</i>	قروه (Qorveh)	تاک (grapevin)	KG3	+	-	+	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	قروه (Qorveh)	تاک (grapevin)	KG5	+	+	-	-	-
<i>A. vitis</i>	مریوان (Marivan)	تاک (grapevin)	KM1	+	-	+	+	-
<i>A. vitis</i>	مریوان (Marivan)	تاک (grapevin)	KM2	+	-	+	-	+
<i>A. vitis</i>	دهگلان (Dehgolan)	تاک (grapevin)	KD1	+	-	+	+	-
<i>A. vitis</i>	دهگلان (Dehgolan)	تاک (grapevin)	KD2	+	-	+	+	-
<i>A. tumefaciens</i>	بیجار (Bijar)	تاک (grapevin)	KB1	+	+	-	-	-
<i>A. vitis</i>	سپیدان (Sepidan)	تاک (grapevin)	Sep1	+	-	+	-	+
<i>A. vitis</i>	سپیدان (Sepidan)	تاک (grapevin)	Sep2	+	-	+	-	+
<i>A. vitis</i>	سی سخت (Sisakht)	تاک (grapevin)	Ss1	+	-	+	-	+
<i>A. vitis</i>	سی سخت (Sisakht)	تاک (grapevin)	Ss2	+	-	+	-	+
<i>A. vitis</i>	دشمن زیاری (Doshman Ziari)	تاک (grapevin)	Dz1 تا Dz3	+	-	+	+	-
<i>A. tumefaciens</i>	خان زنیان (Khaneh Zenyan)	تاک (grapevin)	V.kh1	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	یاسوج (Yasuj)	رز (rose)	Ya 2	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	یاسوج (Yasuj)	رز (rose)	Ya 4	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	یاسوج (Yasuj)	رز (rose)	Ya 5	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	خان زنیان (Khaneh Zenyan)	رز (rose)	Khz2	+	+	-	-	-



Table 3. Continued.

<i>Agrobacterium</i> Species	محل جمع آوری Source	میزبان Natural Host	کد جدایه Isolates	تکثیر قطعه مورد نظر Amplification of target sequence using primer pair:				
				VirD2A/ VirD2C	VCF/ VCR	PGF/ PGR	VisF/ VisR	VirFF1/ VirFR2
<i>A. tumefaciens</i>	خان زنیان (Khaneh Zenyan)	رز (rose)	Khz4	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	خان زنیان (Khaneh Zenyan)	رز (rose)	Khz7	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	کرمانشاه (Kermanshah)	چغندر قند (sugar beet)	Kr1	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	کرمانشاه (Kermanshah)	چغندر قند (sugar beet)	Kr2	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	کرمانشاه (Kermanshah)	چغندر قند (sugar beet)	Kr4	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	اقلید (Eqlid)	چغندر قند (sugar beet)	Egh1	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	اقلید (Eqlid)	چغندر قند (sugar beet)	Egh2	+	+	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i>	اقلید (Eqlid)	چغندر قند (sugar beet)	Egh6 تا Egh4	+	+	-	-	-
<i>A. radiobacter</i>		مرجع	ICMP 5856	+	+	-	-	-
<i>A. vitis</i>		مرجع	ICMP 10752	+	-	+	-	+
<i>A. rhizogenes</i>		مرجع	K599	+	+	-	-	-

+: Amplification of target sequence using primer

+: تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگر

-: Non-amplification of target sequence using primer

-: عدم تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگر

## اثبات بیماری زایی

پس از سه هفته گال‌هایی با ظاهر و اندازه متفاوت در گیاهان مایه زنی شده گوجه‌فرنگی و آفتابگردان مشاهده شد (شکل ۱). برخی از جدایه‌ها در تمام محل زخم‌های ساقه گال ایجاد کردند در حالی که بعضی جدایه‌ها فقط در یک محل زخم سبب ایجاد گال شدند. در روش اثبات

## آزمون‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی جدایه‌ها

همه جدایه‌ها اکسیداز و کاتالاز مثبت و توانایی رشد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و محیط کشت حاوی ۲ درصد نمک را داشتند. بر اساس سایر آزمون‌های افتراقی جدایه‌ها به‌عنوان *A. tumefaciens* و *A. vitis* شناسایی شد.

به عوامل متعددی از جمله زمینه ژنتیکی باکتری، زمینه ژنتیکی گیاه، سازگاری ژنتیکی بین باکتری و گیاه، چگونگی الحاق T-DNA به ژنوم گیاه، بیان ژن‌های بیماری‌زایی باکتری و پلاسמיד Ti بستگی داشته باشد (Knauf et al. 1982). بنابراین برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های عامل گال طوقه، بهتر است از چند گیاه محک استفاده شود.

### تشخیص جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

جدایه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قادر به تکثیر قطعه ۲۲۴ جفت بازی با آغازگر virD2A/virD2C شدند (شکل ۲). تکثیر این ناحیه در ژن *virD2* نشان‌دهنده وجود پلاسמיד Ti در این جدایه‌ها و قابلیت بیماری‌زایی آن‌ها می‌باشد بنابراین، این جدایه‌ها به‌عنوان جنس *Agrobacterium* شناسایی شدند.

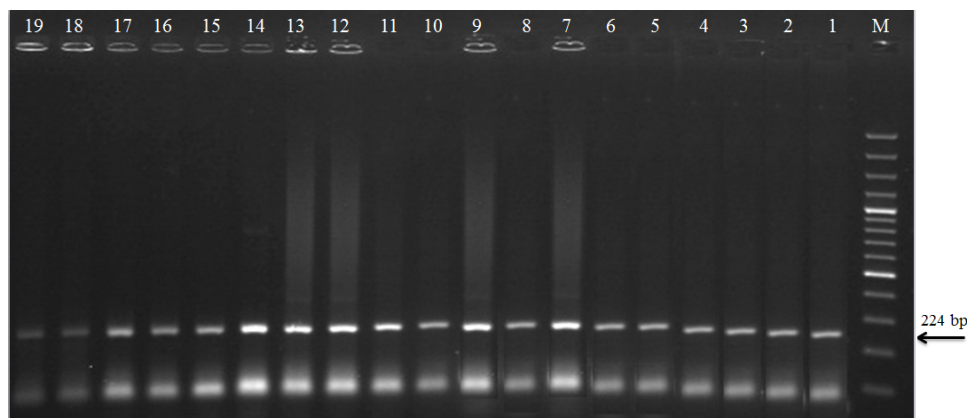
جدایه‌های مربوط به گیاهان رز، چغندر قند و برخی از جدایه‌های مو که قادر به تکثیر قطعه ۷۳۰ جفت نوکلئوتیدی شدند به‌عنوان گونه *A. tumefaciens* تشخیص داده شد (شکل ۳). در این بررسی از ۲۲ جدایه‌ی آگروباکتریوم بیماری‌زا بر روی انگور، ۳ جدایه (حدود ۱۳/۷۵ درصد جدایه‌ها) به‌عنوان *A. tumefaciens* شناسایی شد (جدول ۳). در پژوهش‌های پیشین نیز جدایه‌های *A. tumefaciens* همراه با *A. vitis* به‌عنوان عامل گال طوقه انگور از مناطق مختلف ایران جداسازی شده بود. نتایج این پژوهش و تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که عامل گال طوقه انگور فقط *A. vitis* نمی‌باشد و با توجه به گسترده بودن دامنه میزبانی *A. tumefaciens*، این گونه نیز در تاکستان‌های انگور باعث ایجاد بیماری می‌شود، بنابراین در تحقیقاتی که در رابطه با کنترل بیولوژیک بیماری گال طوقه انگور صورت می‌گیرد، با توجه به اینکه جدایه‌های



شکل ۱- ایجاد علائم گال طوقه روی گیاهان مایه زنی شده توسط جدایه‌های *Agrobacterium* spp. جدا شده از گیاهان انگور، رز و چغندر قند. علائم گال در گوجه فرنگی (a) و آفتابگردان (b) ۲۰ روز پس از مایه زنی. تشکیل بافت کالوس روی ورقه‌های هویج (سمت راست) (c)، ۱۵ روز پس از مایه زنی.

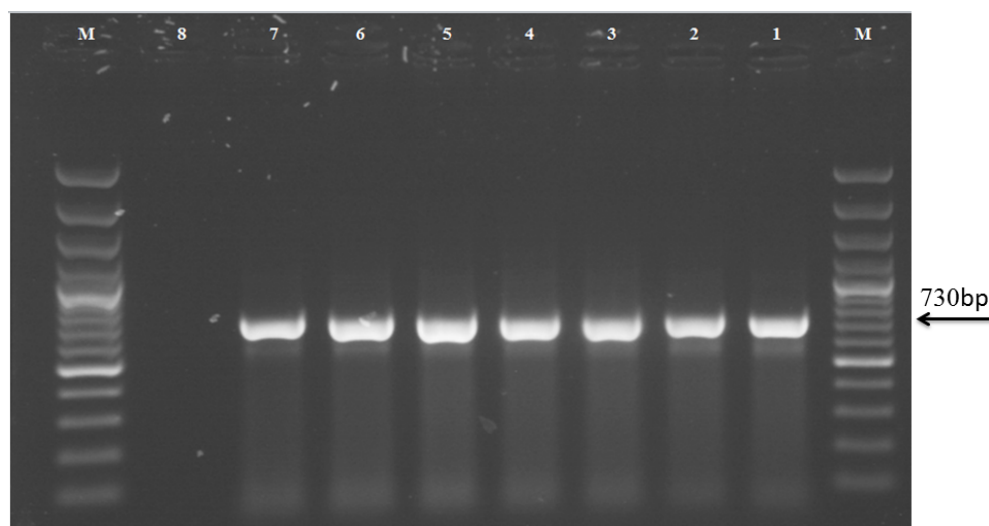
**Fig.1. Crown gall disease symptoms developed on artificially inoculated plants with *Agrobacterium* spp. strains isolated from grapevine, rose and sugar beet in greenhouse conditions. Tomato (a) and sunflower (b) plants with crown gall symptoms at 20 days post inoculation (dpi). Symptomatic carrot disk showing callus formation at 15 dpi (c).**

بیماری‌زایی با روش ورقه هویج نیز بیشتر جدایه‌ها علائم کالوس را بعد از دو تا سه هفته روی ورقه‌های هویج ایجاد کردند (شکل ۱). نتایج نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی از لحاظ بیماری‌زایی روی این گیاهان متفاوت‌اند. تعدادی از جدایه‌ها روی سه گیاه مذکور توانایی ایجاد گال را داشتند اما برخی از جدایه‌ها روی آفتابگردان بیماری‌زا ولی روی دو گیاه دیگر غیر بیماری‌زا بودند. تعدادی از جدایه‌ها روی گوجه‌فرنگی و آفتابگردان گال ایجاد کرده ولی روی هویج بیماری‌زا نبودند. اختلاف در توانای ایجاد گال بر روی گیاهان محک توسط جدایه‌ها می‌تواند



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی قطعه 224 bp از ژن *virD2* با استفاده از جفت آغازگر *VirD2A/ VirD2C* در جدایه‌های مختلف *Agrobacterium*: ICMP 5856 (1), KS1 (2), KG1 (3), KG2 (4), KG5 (5), KM1 (6), KM2 (7), KD1 (8), KD2 (9), KB1 (10), Sep2 (11), Ya2 (12), Ya5 (13), Khz4 (14), Khz7 (15), Kr1 (16), Egh2 (17), Egh5(18) و Egh6(19)

Figure. 2. Electrophoresis of the 224bp fragment of the *virD2* gene amplified in PCR by *VirD2A/ VirD2C* primer of *Agrobacterium* isolates. ICMP 5856 (1), KS1 (2), KG1 (3), KG2 (4), KG5 (5), KM1 (6), KM2 (7), KD1 (8), KD2 (9), KB1 (10), Sep2 (11), Ya2 (12), Ya5 (13), Khz4 (14), Khz7 (15), Kr1 (16), Egh2 (17), Egh5(18) and Egh6(19)

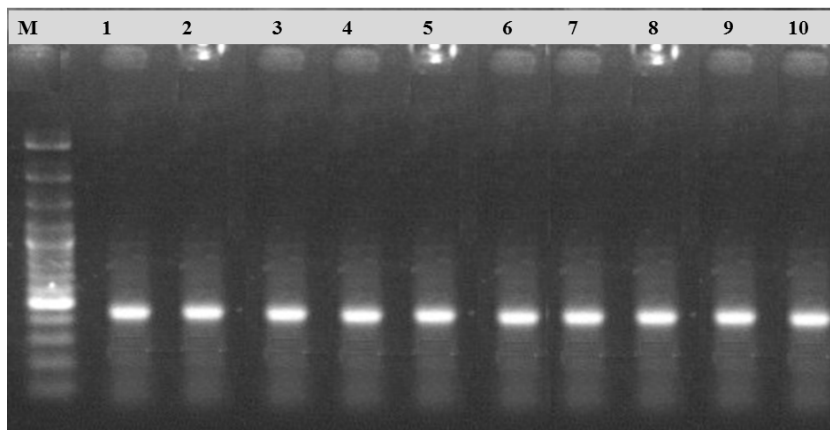


شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از جفت آغازگر *VCF/ VCR* و تکثیر قطعه 730 bp در جدایه‌های *Agrobacterium tumefaciens*: ICMP5856 (۱), Ya2 (2), Ya5 (3), Khz4 (4), Khz7 (5), Kr1 (6), Egh2 (7) و *Agrobacterium vitis* (8)

Fig. 3. Electrophoresis of the 730 bp fragment amplified in PCR by *VCF/ VCR* primer of *Agrobacterium tumefaciens* isolates ICMP5856 (1), Ya2 (2), Ya5 (3), Khz4 (4), Khz7 (5), Kr1 (6), Egh2 (7), and *A. vitis* (8).

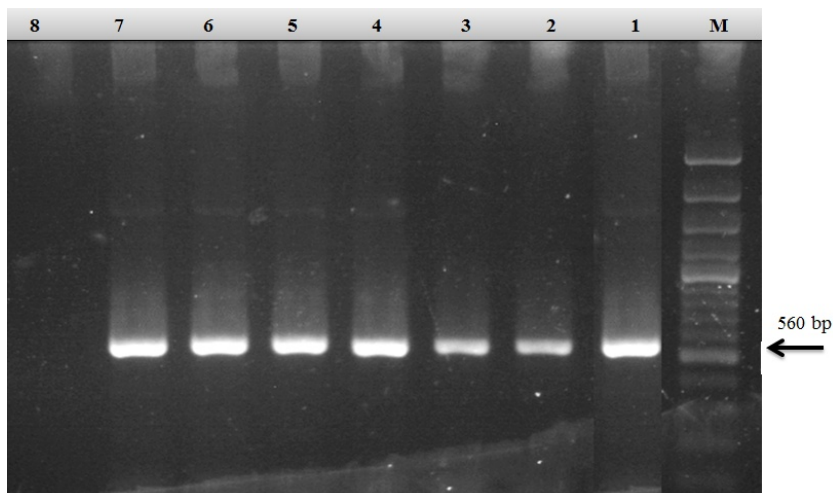
از بین گونه‌های اگروباکتریوم جدایه‌های *A. vitis* قادر به تولید آنزیم پلی گالاتوروناز می‌باشند (Bini *et al.* 2008). بنابراین در این پژوهش جدایه‌هایی که با استفاده از جفت آغازگر PGF/PGR قادر به تکثیر قطعه ۴۶۶

غیر بیماری‌زا برای کنترل هر گونه متفاوت می‌باشد؛ باید در مرحله اول ترکیب جمعیتی و میزان پراکنش این دو گونه در تاکستان‌ها شناسایی شود (Salehi Ardekani *et al.* 2000, Salehi *et al.* 2006).



شکل ۴- تکثیر قطعه ۴۶۰ bp با استفاده از جفت آغازگر PGF/PGR توسط جدایه‌های *Agrobacterium vitis*: جدایه مرجع (۱) *A.vitis* ICMP10752، KS1 (2)، KG1 (3)، KG2 (4)، KG5 (5)، KM1 (6)، KM2 (7)، KD1 (8)، KD2 (9)، KB1 (10).

Fig. 4. Electrophoresis of the 460 bp fragment amplified in PCR by PGF/PGR primer of *Agrobacterium vitis* isolates. *A. vitis* ICMP10752 (1), KS1 (2), KG1 (3), KG2 (4), KG5 (5), KM1 (6), KM2 (7), KD1 (8), KD2 (9), KB1 (10).



شکل ۵- قطعه ۵۶۰ bp تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر VisF/VisR توسط جدایه‌های *Agrobacterium vitis*: KS1 (1)KS3 (2)، Dz1 (3)، Dz2 (4)، KM1 (5)، KD1 (6)، KD2 (7)، Sep2(8).

Fig. 5. Electrophoresis of the 560 bp fragment amplified in PCR by VisF/VisR primer of *Agrobacterium vitis* isolates. KS1 (1) KS3 (2), Dz1 (3), Dz2 (4), KM1 (5), KD1 (6), KD2 (7), Sep2(8)

#### تعیین نوع اوپین جدایه‌های *A. vitis*

برای بررسی و تفاوت ساختاری پلاسمید Ti جدایه‌های *A. vitis* از نشانگرهای اوپینی استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۱۹ جدایه *A.vitis* ۱۱ جدایه آن (۵۷/۹ درصد از جدایه‌ها) با آغازگرهای VisF/VisR

جفت بازی از ژن مولد آنزیم پلی گلاکتوروناز بودند، به‌عنوان *A. vitis* شناسایی شدند(شکل ۴). این جدایه‌ها دارای پرگنه مشخص این گونه روی محیط RS بودند. بنابراین، وجود ژن پلی گلاکتوروناز نیز تأییدی بر صحت شناسایی گونه است.

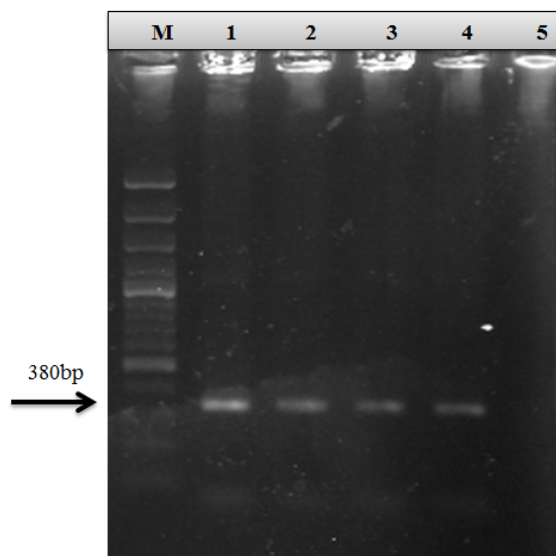
اساس گزارش جواهری و همکاران (Javaheri *et al.* 2000). جدایه‌های *A. vitis* در استان‌های تهران و قزوین فقط اکتوپین و نوپالین تولید می‌کنند. و همچنین بر اساس مطالعات ریده و همکاران روی جدایه‌های *A. vitis* فرانسه اعلام کردند که ۷۵ درصد از جدایه‌های دارای اکتوپین می‌باشند، نوپالین (۲۰ درصد) و ویتوپین (۵ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (Ridé *et al.*, 2000).

تعیین نوع Ti پلاسمید براساس ژن‌های کدکننده اوپین می‌باشد و از طرف دیگر بین نوع Ti پلاسمید و میزبان باکتریایی ارتباط پایداری وجود دارد، از این رو، این تولید اوپین در نتیجه تعامل پیچیده بین میزبان و باکتری می‌باشد و نوع آن به استرین باکتری، گونه و رقم گیاه میزبان ارتباط دارد (Kuzmanović *et al.* 2014).

همان‌طور که در جدول ۳ آورده شده است، جدایه‌های *A. vitis* جدا شده از یک تاکستان در شهرستان مریوان دارای هر دو نوع اوپین، ویتوپین و اکتوپین/نوپالین می‌باشد، که این اطلاعات نشان می‌دهد که در یک منطقه کوچک و حتی در داخل یک تاکستان بیش از یک نوع Ti پلاسمید وجود دارد که با نتایج پژوهش‌های قبلی مبنی بر وجود بیش از یک نوع Ti پلاسمید در یک منطقه تطابق دارد (Moore *et al.*, 1997).

### نتایج واکاوی داده‌های ژنوتیپی حاصل از آغازگرهای تصادفی

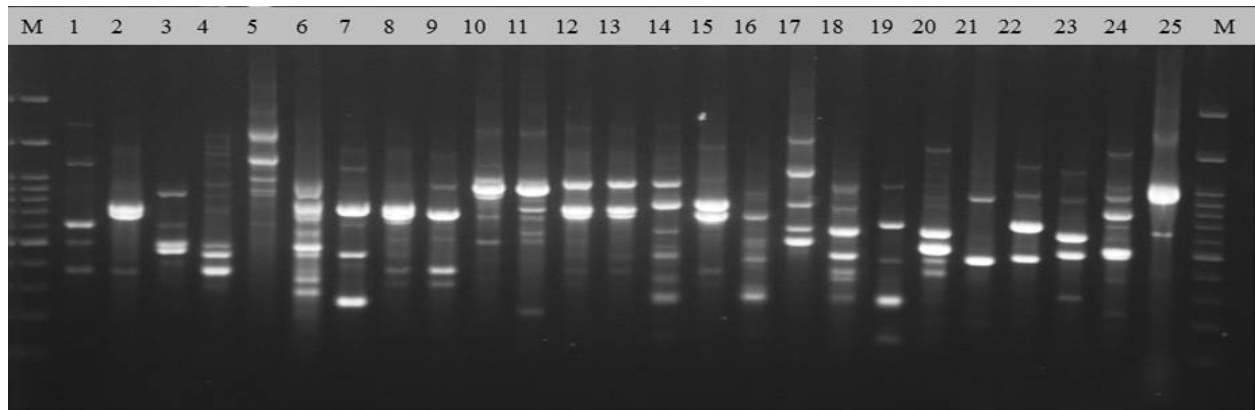
با استفاده از آغازگرهای تصادفی A9، A10، R13، OPE2، OPE7، OPE14 و OPE20 در ۲۲ جدایه *A. tumefaciens* و ۱۹ جدایه *A. vitis* به ترتیب حدود ۶۱۰ و ۵۵۰ باند با وزن مولکولی ۱۳۰bp تا ۲۰۰۰bp تکثیر شد که هر آغازگر به‌طور متوسط حدود ۴ باند در هر جدایه تکثیر کرد (شکل‌های ۷ و ۸).



شکل ۶- قطعه ۳۸۰ bp تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر VisFF1/ R2 در جدایه‌های *Agrobacterium vitis* KM2 (1)، Ss1 (2)، Sep1 (3)، Sep2 (4)، KD2 (5).

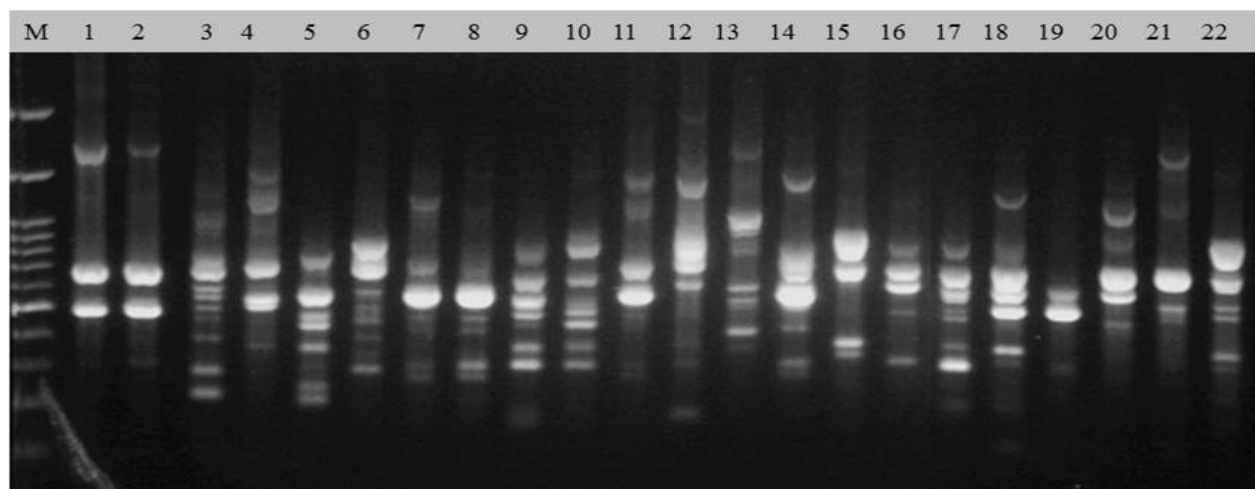
Fig . 6. Electrophoresis of the 380 bp fragment amplified in PCR by VisFF1/ R2 primer of *Agrobacterium vitis* isolates. KM2 (1), Ss1 (2), Sep1 (3), Sep2 (4), KD2 (5).

قادر به تکثیر قطعه ۵۶۱ جفت نوکلئوتیدی بودند (شکل ۵) بنابراین اوپین این جدایه‌ها ویتوپین تشخیص داده شد. ۵ جدایه (۲۶/۳ درصد از جدایه‌ها) دارای اوپین اکتوپین / نوپالین بودند که با آغازگرهای VisFF1/ R2 قطعه ۳۸۰ جفت نوکلئوتیدی تکثیر شد (شکل ۶). ۱۵/۸ درصد جدایه‌ها قادر به تکثیر هیچ یک از قطعات ذکر شده نبودند، بنابراین احتمالاً اوپین تولید شده توسط این جدایه‌ها از اوپین‌های رایج (ویتوپین، اکتوپین و نوپالین) نیستند (جدول ۳). بر اساس تحقیقات روح رضی (Rouhrazia 2011) در بین جدایه‌های *A. vitis*، جدایه‌های دارای ویتوپین بیشترین سهم را دارند و جدایه‌های اکتوپین و نوپالین در رتبه‌های بعدی قرار می‌گیرند. بنابراین نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های پژوهش قبلی در غالب بودن جمعیت‌های ویتوپین مطابقت دارد. از طرف دیگر، بر



شکل ۷- مقایسه نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگر A10 در آزمون RAPD. M: مارکر (1kb DNA) جدایه های رز شماره ۱ تا ۱۰ (1) Khz4, (2) ya5, (3) ya1, (4) ya2, (5) ya5, (6) ya2, (7) kh2, (8) kh3, (9) kh5, (10) kh7). *Agrobacterium tumefaciens* جدا شده از چغندر قند شماره ۱۱ تا ۱۹: (11) Egh1, (12) Egh2, (13) Egh4, (14) Egh5, (15) Egh6, (16) Egh6, (17) kr1, (18) kr2, (19) kr3, (20) KB1, (21) V.Kh1, (22) KG5). *A. tumefaciens* جدا شده از انگور شماره ۲۰ تا ۲۲ (20) KB1, (21) V.Kh1, (22) KG5). جدایه های مرجع (23) *A. radiobacter* ICMP 5856, (24) *A. vitis* ICMP 10752, (25) *A. rhizogenes* K599.

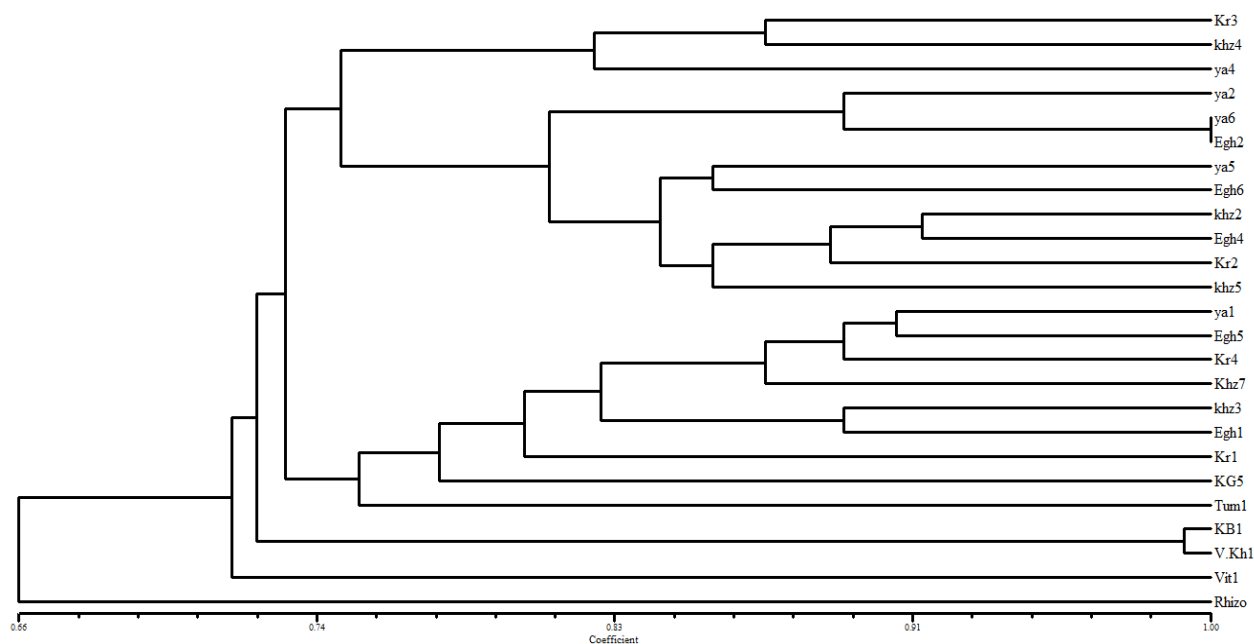
Fig 7. RAPD fingerprinting from genomic DNA of isolates using A10 primer. M: DNA molecular size marker (1kb DNA). Lines 1- 10 isolates of rose: 1(Khz4), 2 (ya5), 3(ya1), 4(ya2), 5(ya5), 6(ya2), 7(kh2), 8 (kh3), 9 (kh5), 10 (kh7). *Agrobacterium tumefac* isolated from sugar beet: 11 (Egh1), 12 (Egh2), 13 (Egh4), 14 (Egh5), 15 (Egh6), 16 (kr1), 17 (kr2), 18 (kr3), 19 (kr4). *A. tumefac* isolated from grapevine: 20 (KB1), 21 (V.Kh1), 22 (KG5). reference strains (23) *A. radiobacter* (ICMP 5856), (24) *A. vitis* (ICMP 10752) and (25) *A. rhizogenes* (K599)



شکل ۸ نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگر OPE14 در آزمون RAPD. M: مارکر (1kb DNA) جدایه های *Agrobacterium vitis* جدا شده از انگور. (1) Ks2, (2) Ks3, (3) Ks4, (4) Ks5, (5) KG1, (6) KG2, (7) KG3, (8) KG4, (9) KD1, (10) KD2, (11) KB2, (12) SS1, (13) SS2, (14) SS3, (15) Sepi1, (16) Sepi2, (17) DZ1, (18) DZ2, (19) DZ3). جدایه های مرجع (20) *A. radiobacter* ICMP 5856, (21) *A. vitis* ICMP 10752, (22) *A. rhizogenes* K599.

Fig. 8. RAPD fingerprinting from genomic DNA of isolates using OPE14 primer. M: DNA molecular size marker (1kb DNA). *Agrobacterium vitis* isolated from grapevine : Lines 1 (Ks2), 2 (Ks3), 3 (Ks4), 4 (Ks5), 5 (KG1), 6 (KG2), 7 (KG3), 8 (KG4), 9 (KD1), 10 (KD2), 11 (KB2), 12 (SS1), 13 (SS2), 14 (SS3), 15 (Sepi1), 16 (Sepi2), 17 (DZ1), 18 (DZ2), 19 (DZ3); reference strains 20 *A. radiobacter* (ICMP 5856) *A. vitis* (21), ICMP 10752), 22 *A. rhizogenes* (K599).





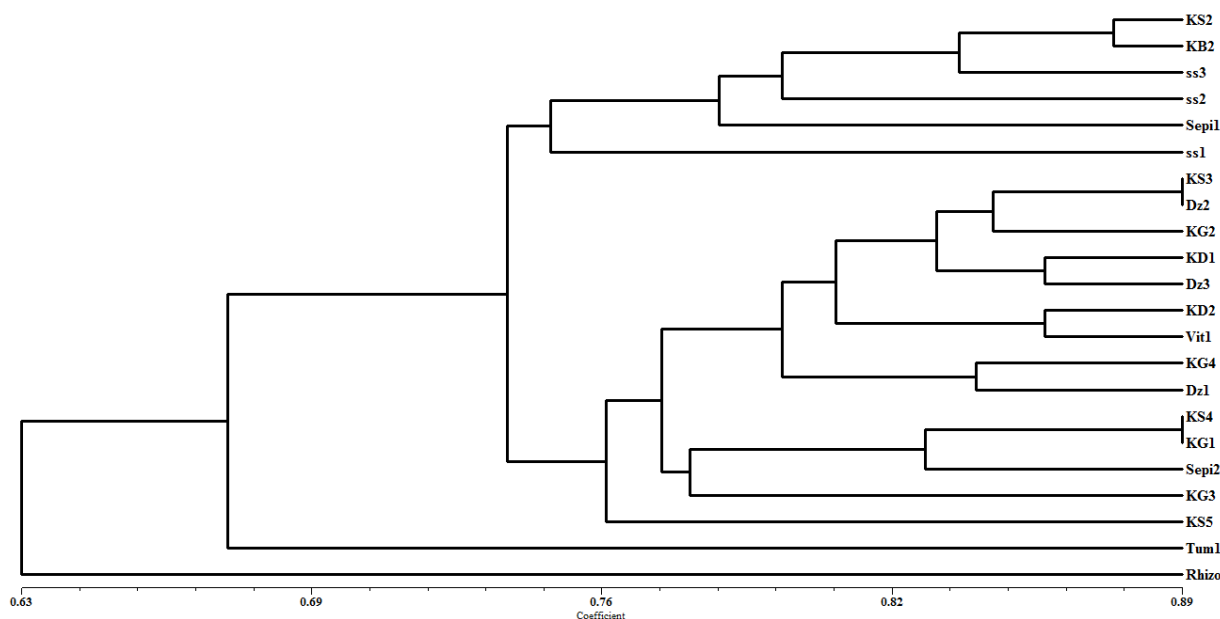
شکل ۹- دندروگرام رسم شده با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc version 2.02 براساس هفت آغازگر تصادفی A9، A10، R13، OPE2، OPE7، OPE14، OPE20. در آزمون RAPD در جدایه های *Agrobacterium tumefaciens* جدا شده از میزبان‌های مو، گل رز، چغندر قند و جدایه های مرجع *A. radiobacter* ICMP 5856 (tum1) *A. vitis* ICMP 10752 (vit1) و *A. rhizogens* K599

Fig. 9. A dendrogram based on seven random primers A9, A10, R13, OPE2, OPE7, OPE14, OPE20 using Ntsys-pc version 2.02. *Agrobacterium tumefaciens* isolated from rose, grapevine, sugar beet and reference strains of *A. radiobacter* (ICMP 5856), *A. vitis* (ICMP 10752), *A. rhizogens* (K599)

جدایه‌های مرجع (*A. rhizogens* (K599) و ICMP) *A. radiobacter* 5856) به ترتیب در سطح تشابه ۶۳ درصد و ۶۷ درصد از جدایه‌های *A. vitis* جدا شدند. جدایه‌های *A. vitis* در سطح تشابه ۷۴ درصد به دو گروه تقسیم شد. گروه اول شامل بیشتر جدایه‌های *A. vitis* جدا شده از مناطق مختلف به همراه جدایه مرجع *A. vitis* (ICMP 10752) بود. در گروه دوم تعداد کمی از جدایه‌های *A. vitis* جدا شده از شهرستان‌های سپیدان، سی سخت و بیجار قرار گرفت. تنوع زیادی بین جدایه‌های *A. vitis* از مناطق مختلف مشاهده شد (شکل ۱۰).

هیچ یک از هفت آغازگر مورد استفاده در آزمون RAPD جدایه‌ها را بر اساس منطقه جغرافیایی و یا بر اساس میزبان تفکیک نکردند. باکتری‌های جدا شده از یک میزبان

جدایه‌های مرجع (*A. rhizogens* (K599) / NCPPB2659) به ترتیب در سطح تشابه ۶۶ درصد و ۷۲ درصد از جدایه‌های *A. tumefaciens* جدا شدند. جدایه‌های *A. tumefaciens* در سطح تشابه حدود ۷۳ درصد به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل دو جدایه *A. tumefaciens* جدا شده از انگور (KB1 و V.Kh1) بود. در گروه دوم یک جدایه *A. tumefaciens* جدا شده از انگور (KG5)، چهار جدایه رز از یاسوج و خان زنیان، چهار جدایه از چغندر قند اقلید و کرمانشاه به همراه جدایه مرجع *A. tumefaciens* قرار گرفتند. گروه سوم در سطح ۷۴ درصد به دو زیرگروه تقسیم شد که هر کدام شامل جدایه‌های رز و چغندر قند از مناطق مختلف بود (شکل ۹).



شکل ۱۰- دندروگرام رسم شده با استفاده از ۷ آغازگر A9، A10، R13، OPE2، OPE7، OPE14، OPE20. در آزمون RAPD در جدایه‌های گونه *Agrobacterium vitis*، جدا شده از میزبان مو و جدایه‌های مرجع *A. radiobacter* ICMP 5856(tum1) K599، *A. vitis* ICMP 10752(vit1) و *A. rhizogens*

Fig.10. A dendrogram based on seven random primers A9, A10, R13, OPE2, OPE7, OPE14, OPE20 using Ntsys-pc version 2.02., *Agrobacterium vitis* isolated from grapevine, and reference strains of *A. radiobacter* (ICMP 5856) *A. vitis* (ICMP 10752) *A. rhizogens* (K599)

مواقع باندهای مشترکی بین جدایه‌های یک نهالستان یا یک میزبان مشاهده می‌شود (Pulawska & Kałużna, 2011, Momol et al. 1998).

مطالعات پیشین نشان داده، Ti پلاسمید علاوه بر توانایی ایجاد گال، تا حدود زیادی در تعیین دامنه میزبانی آگروباکتریوم دخیل می‌باشد (Knauf et al., 1982)، این پلاسمید در خاک به راحتی بین جدایه‌های آگروباکتریوم مختلف منتقل می‌شود در نتیجه این انتقال، جدایه‌هایی با کورموزم‌های مختلف بر روی یک میزبان مشترک ایجاد گال می‌کنند (shams et al., 2013, Pulawska, 2012). زمانی که این جدایه‌ها توسط آغازگرهای RAPD مورد ارزیابی قرار می‌گیرند با وجود اینکه از یک میزبان مشترک هستند اما چون از لحاظ

مشخص دارای الگوهای باندهای متفاوتی بودند. به طور مثال، حتی بین جدایه‌های جدا شده از چغندر قند در منطقه اقلید یا کرمانشاه (یک میزبان و از یک منطقه جغرافیایی) تنوع بالایی دیده شد.

در پژوهش‌های قبلی نیز وجود باندهای متفاوت در جدایه‌های آگروباکتریوم با میزبان مشترک (درختان هسته‌دار) با استفاده از آغازگرهای RAPD نیز گزارش شده است (Llop et al. 2003) همچنین در بررسی‌های دیگر با استفاده از آزمون RAPD بر روی جدایه‌های *A. vitis* و *A. tumefaciens* جدا شده از درختان هسته‌دار و انگور از کشورهای لهستان، آمریکا، فرانسه، استرالیا و یونان مشخص شد که بین تنوع ژنتیکی و منطقه جغرافیایی و یا میزبان ارتباط روشنی وجود ندارد اگرچه در برخی



شناخته شده است که دارای ۱۱ گونه ژنومی (G1 تا G9)، G13 و G14) می‌باشد و تاکنون اسم گونه‌های *A. fabrum*، *R. pusense* و *R. nepotum* *A. radiobacter* به ترتیب برای گونه‌های ژنومی G4، G8، G14 و G2 معرفی شده است (Costechareyre et al., 2010). در ایران نیز پژوهشی به منظور تعیین گونه‌های ژنومی *Agrobacterium* عامل گال طوقه در چغندر قند شهرستان اقلید با استفاده از توالی یابی ژن *gyrb* صورت گرفت، نتایج آن پژوهش نشان داد که این جدایه‌ها به گونه‌های ژنومی ۳ و ۷ (G3 و G7) تعلق دارد (Mafakheri et al., 2016) که نتایج حاصل از آزمون RAPD مبنی بر وجود تنوع در داخل جمعیت‌های آگروباکتریوم در یک میزبان و منطقه را به اثبات می‌رساند.

#### معیارهای سودمندی آغازگرهای تصادفی RAPD

##### محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)

میزان PIC محاسبه شده برای آغازگرها یک عدد بین صفر تا یک می‌باشد که هرچه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد نشان‌دهنده میزان بالای چندشکلی در بین جدایه‌ها می‌باشد. در این پژوهش آغازگر تصادفی OPE14 نسبت به سایر آغازگرها بیشترین میزان PIC را داشت و به عبارت دیگر زمانی که از این آغازگر استفاده می‌شوند میزان چندشکلی و وجود باندهای منحصربه‌فرد برای هر جدایه افزایش می‌یابد در مقابل آغازگر تصادفی A10 میزان PIC کمتری نسبت به سایر آغازگرها داشت (جدول ۴).

##### احتمال همسانی

میزان احتمال همسانی مشاهده شده در بین این هفت نشانگر، بین ۰/۰۳۱-۰/۰۲۱ متغیر بود. آغازگر تصادفی OPE14 کم‌ترین و آغازگر تصادفی OPE2 بیشترین مقدار PI را دارا بودند. این بدان معنی است که نشانگر OPE2

کورو موزم متفاوت هستند، الگوهای باندهای متفاوتی ایجاد می‌کنند و در برخی از آغازگرها تعدادی از جدایه‌های دارای باندهای منحصربه‌فرد می‌باشند.

در این پژوهش نیز نتایجی در رابطه با این موضوع به دست آمده است. بر اساس جدول ۳، جدایه‌های *A. vitis* از یک منطقه جغرافیایی دارای یک نوع اوپین و در نتیجه یک نوع Ti پلاسمید می‌باشند به طور مثال جدایه Sepi1 و Sepi2 از شهرستان سپیدان هر دو دارای اوپین، اکتوپین/نوپالین می‌باشند اما نتایج حاصل از آزمون RAPD نشان می‌دهد که این جدایه با وجود تشابه در نوع Ti پلاسمید اما دارای الگوهای باندهای متفاوتی بود و در دندروگرام حاصل از آنالیز هفت آغازگر ریپد (شکل ۱۰) از هم فاصله زیادی دارند و در دو گروه با سطح تشابه ۷۴ درصد قرار گرفته‌اند.

با توجه به دندروگرام‌های حاصل از هفت آغازگر RAPD (شکل ۹ و ۱۰) مشخص شد که جدایه‌های متعلق به *Agrobacterium* بیوار ۱ (*A. tumefaciens*) در مقایسه با *A. vitis* دارای تنوع بیشتری می‌باشد. در پژوهش پولواسکا و همکاران با استفاده از آغازگرهای RAPD و مقایسه توالی ژن *gyrb* تنوع بالای در جمعیت‌های *A. tumefaciens* (بیوار ۱) نسبت به جدایه‌های *A. rhizogenes* (بیوار ۲) مشاهده شده بود (Puławska & Kałużna, 2011). در حالت کلی گونه *A. vitis* نسبت به دو گونه دیگر دارای تنوع کمتر در داخل جمعیت می‌باشد که علت این امر سیستمیک بودن *A. vitis* در داخل بافت میزبان می‌باشد، در این حالت شانس کمتری برای تبادل با جمعیت گسترده و متنوع آگروباکتریوم در خاک دارد (Puławska, 2010).

بیوار ۱ در حال حاضر به عنوان یک گونه هتروژن می‌باشد و تحت عنوان گونه کمپلکس *A. tumefaciens*

دارد. همچنین بین PIC و PI رابطه معکوس وجود دارد به عبارت دیگر با افزایش میزان چندشکلی احتمال همسانی بین جدایه‌ها کاهش پیدا می‌کند. کم‌ترین تعداد باندها توسط آغازگر R13 (۶۶باند) تکثیر شد، در حالی است که کم‌ترین میزان PIC مربوط به آغازگر A10 بود بنابراین ممکن است بین تعداد باندهای تکثیری و PIC رابطه مستقیم وجود نداشته باشد به این معنی که افزایش تعداد باند همیشه به منزله افزایش چندشکلی نیست. با توجه به معیارهای سودمندی آغازگرهای تصادفی می‌توان آغازگر OPE14 به عنوان بهترین آغازگر جهت تفکیک جدایه‌ها معرفی کرد.

آنالیز داده‌های آزمون RAPD در این پژوهش نشان می‌دهد که در داخل جمعیت گونه‌های *A. tumefaciens* و *A. vitis* از میزبان‌های رز، چغندر قند و انگور در برخی از استان‌های جنوبی و غربی ایران تنوع ژنتیکی زیادی وجود دارد. در پژوهش‌های پیشین نیز وجود میزان بالایی از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های آگروباکتریوم به دست آمده از گیاهان باغی و زینتی در ایران با استفاده از نشانگرهای REP-PCR، BOX-PCR و IS50 به اثبات رسیده است (Safdari et al., 2010; Salehi et al., 2006; Shahabi Mohammad Abadi et al. 2012; Rouhrazi & Rahimian, 2012). بنابراین بر اساس گزارش‌های متعدد از وجود این بیماری در باغ‌ها، نهالستان‌ها و گلخانه‌های پرورش گیاهان زینتی از اکثر نقاط ایران و همچنین شیوع شدید این بیماری در گیاه زراعی چغندر قند در شهرستان اقلید در چند سال اخیر (Mafakheri et al., 2016) و با توجه به تنوع بالای ژنتیکی در جمعیت‌های این بیمارگر، گونه‌های مختلف آگروباکتریوم یک تهدید جدی برای باغ‌های و نهالستان‌های تازه احداث شده می‌باشد.

جدول ۴ - معیارهای سودمندی آغازگرهای تصادفی RAPD

Table 4. Usefulness of random primers of RAPD			
primer	PIC	PI	D
A9	0.691	0.022	0.978
A10	0.690	0.022	0.978
OPE2	0.751	0.031	0.969
OPE 7	0.735	0.023	0.977
OPE 14	0.894	0.021	0.979
OPE20	0.704	0.023	0.977
R13	0.782	0.024	0.976

ممکن است به احتمال ۳/۱٪، دو نمونه مستقل از یکدیگر را مشابه تشخیص دهد. در آزمون RAPD که میزان چندشکلی خیلی بالایی را نشان می‌دهند، (جدول ۴). میزان احتمال همسانی ممکن است کمتر از ۰/۰۵ باشد (Sefck et al. 2001).

#### قدرت تفکیک

معیار قدرت تفکیک یکدیگر شاخص‌های انتخاب بهترین آغازگر می‌باشد. میزان قدرت تفکیک عددی بین صفر تا یک می‌باشد و هرچه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد نشان دهنده کارایی بیشتر آغازگر برای تفکیک دو جدایه از هم می‌باشد. میزان قدرت تفکیک محاسبه شده در این هفت نشانگر، بین ۰/۹۸۰-۰/۹۶۹ متغیر بود. بیشترین قدرت تفکیک مربوط به آغازگر تصادفی OPE14 بود و همچنین این آغازگر بیشترین تعداد باند تکثیری را نسبت به سایر آغازگرها تکثیر می‌کرد. از طرف دیگر کمترین قدرت تفکیک مربوط به آغازگر تصادفی OPE2 بود. (جدول ۴).

با توجه به این که بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک (D) در آغازگر OPE14 مشاهده شده می‌توان نتیجه گرفت که بین PIC و D رابطه مستقیم وجود دارد یعنی آغازگری که میزان چندشکلی بیشتری را نشان دهد توانایی تفکیک بالاتری را

## منابع

- Ale-Yasin S.K. and Banihashemi Z. 1993. Isolation of causal agent of crown gall of grapevine in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. Proceedings of the 11th Iranian Plant Protection Congress. Rasht, Iran. 215(Abst.).
- Amani B. 1966. Crown gall of grapevine. Iranian Journal of Plant Pathology. 3:12-20. (In Farsi with English Summary).
- Arabi F., Nikravesh Z., Rezaeian V. and Rahimian H. 2002. Bacterial leaf spot of *Sisymbrium irio* in Tehran province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. University of Tabriz, p 253
- Bini F., Kuczmog A., Putnoky P., Otten L., Bazzi C. and Szegedi E. 2008. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. Vitis. 47:181-9.
- Costechareyre D., Rhouma A., Lavire C., Portier P., Chapulliot D., Bertolla F., Boubaker A., Dessaux Y. and Nesme X. 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. Microbial Ecology 60:862-872.
- De Cleene M. and De Ley J. 1976. The host range of crown gall. The Botanical Review 42: 389-466.
- Fatehi R., Mohammadi M., Rahimian H., Sharifi-Tehrani A. and Zakeri Z. 1998 Identification and phenotypic characterization of *Agrobacterium vitis* the causal agent of crown gall disease of grapes in Karaj and Takestan regions. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. University of Karaj, p 250.
- Haas J.H., Moore L.W., Ream W. and Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology 61:2879-84.
- Irani H. and Ghasemi A. 2004. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 crown gall disease agent and study of population in sap and infected vineyards soil. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. University of Tabriz, p.358.
- Irelan N. A. and Meredith C. P. 1996. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* using randomly amplified polymorphic DNA. American Journal of Enology and Viticulture. 47:145-151.
- Javaheri M., Mohammadi H., Rahimian H. and Sharifi-Tehrani. 2000. Detection of opines produced by tumorigenic strains of *Agrobacterium* on grapevines in Iran. Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress. University of Isfahan, p.343.
- Kawaguchi A., Sawada H. and Ichinose Y. 2008. Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. Plant Pathology 57:747-753.
- Knauf V., Panagopoulos C. and Nester E. 1982. Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathology 72:1545-1549.
- Kuzmanovic N., Ivanovic M., Prokic A., Gasic K., Zlatkovic N. and Obradovic A. 2014. Characterization and phylogenetic diversity of *Agrobacterium vitis* from Serbia based on sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. European Journal of Plant Pathology 140:757-768.
- Llop P., Lastra B., Marsal H., Murillo J. and López M.M. 2003. Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumors. European Journal of Plant Pathology 109:381-389.
- Mafakheri H, Taghavi S. M, Banihashemi Z, Osdaghi E. and Lamichhane J. R. 2016. Pathogenicity, host range and phylogenetic position of *Agrobacterium* species associated with sugar beet crown gall outbreaks in Southern Iran. European Journal of Plant Pathology. 147:721-730.
- Maki-Valkama T. and Karjalainen R. 1994. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica and carotovora by RAPD-PCR. Annals of Applied Biology 125:301-309.
- Mareft A.S. and Hassanzadeh N. 1998. Bacterial crown gall in imported cherry and apple seedling. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. University of Tehran, 254-254.
- Momol E., Burr T., Reid C., Momol M., Hseu S. and Otten L. 1998. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5'-end of the 23S rRNA gene and Random Amplified Polymorphic DNA. Journal of Applied Microbiology 85: 685-92.
- Moore L.W., Bouzar H. and Burr T.J. 2001. Gram-negative bacteria: *Agrobacterium*. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W, editors. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul (MN). APS Press, 17-35.
- Naghavi M. R., Ghariazi B. and Hosseini Salekdeh. 2007. Molecular Marker. 2<sup>th</sup> ed. University of Tehran

- Press.334 p.
- Niknezhad Kazempour M., Roustaei A. and Rezaei M . 2007. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*, the causal agent of crown gall disease, from cypress in Kashan. Iranian Journal of Plant Pathology. 43: 398-409. (In Farsi with English Summary).
- Pooler M.R . and Hartung J.S . 1995. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. Current Microbiology, 31:134-137.
- Puławska J. 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. Journal of Plant Pathology .92:87-98.
- Puławska J. and Kałużna M. 2011 . Phylogenetic relationship and genetic diversity of *Agrobacterium* spp. isolated in Poland based on *gyrB* gene sequence analysis and RAPD. European Journal of Plant Pathology 133:379–390.
- Rademaker J. L. W., and de Bruijn F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis, p. 151–171. In G. Caetano-Anolle's and P. M. Gresshoff (ed.), DNA markers: protocols, applications, and overviews. J. Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Rouhrazi K. and Rahimian H. 2012. Genetic diversity of Iranian *Agrobacterium* strains from grapevine. *Annals of Microbiology* 62:1661-1667.
- Rouhrazia K. 2011. Determination of Rhizobium species and heterogeneity of strains causing grapevine crown gall disease in West Azarbayjan Province. MS Thesis. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. P 121.
- Safdari M, Rahimian H, Hejazi MA. and Barzegari A . 2010 . A study on the genotypic diversity of the regional *Agrobacterium* by means of REP-PCR and BOX-PCR. Proc. 19th, Irania Plant Protection Congress. Iran. Research Institute of Plant Protection. Tehran. p 519.
- Salahi Ardekani A ., Taghavi S.M. and Banihashemi Z. 2000. Distribution and identification of strains of the causal agent of crown gall of grapevine in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. Iranian Journal of Plant Pathology. 36: 313-328. (In Farsi With English Summary).
- Salehi S., Ghasemi A., Rahimian H. and Nazeriyan I. 2003. Occurrence of aerial gall disease of *Ficus benjamina* caused by *Agrobacterium larrymoorei* in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 39:107-108. (In Farsi with English Summary).
- Salehi S., Rahimian H. and Ghasemi A. 2006. Diversity of *Agrobacterium tumefaciens* strains in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 42:337-358. (In Farsi With English Summary)
- Sawada H. and Ieki H. 1992. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 58:37-45.
- Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001 . Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society Press, USA. 373p.
- SefcK M., Lefort F., Grando S., Scott K.D., Steinkellner H. and Thomas M.R. 2001. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. in: Roubelakis. K. A. Molecular biology and biotechnology of grapevine. Kluwer Academic Publisher 433-444.
- Shahabi Mohammad Abadi M., Taghavi S.M. and Djavaheri M. 2012. Phenotypic and genotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates from different hosts in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces Iranian Journal of Plant Pathology. 48:113 -115. (In Farsi With English Summary).
- Shams M. 2012. Assessing the diversity of agrobacterial populations. PhD Thesis. Universite Claude Bernard Lyon 1.P 105
- Rouhrazia K. and Rahimian H.A. 2014. Biochemical and genetic characterisation of *Agrobacterium tumefaciens* the causal agent of walnut crown gall disease in Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47(20):2493–2500
- Shams M., Vial L., Chapulliot D., Nesme X. and Lavire C. 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. Systematic and Applied Microbiology. 351–358.
- Szegedi E. and Bottka S. 2002. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. Vitis 41:37-42.
- Szegedi E . 2003. Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. Vitis42: 39-41
- Taghavi S.M. and Golkhandan E. 2005. Distribution and etiology of crown gall of sugar beet in Fars and

- Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. Iranian Journal of Plant Pathology. 42:439-457. (In Farsi with English Summary).
- Tzfira T. and Citovsky V. 2008. *Agrobacterium*: from Biology to Biotechnology. Springer.
- Xu, Y., M. Rong-Cai, H. Xie and C. Ming-Qing. 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and Mediterranean region. Genome 47:1091-1104
- Young J.M., Park D.C. and Weir B.S. 2004. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. FEMS Microbiology letters 238:125-31.
- Young J.M., Pennycook S.R. and Watson D.R. 2006. Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an opinion. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:491-493.