

## بررسی خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی عامل بلایت گردو در استان‌های فارس و لرستان

### Genotypic and Phenotypic Diversity of the Casual agent of Bacterial Blight of Walnut in Fars and Lorestan Provinces

حسین میرزایی نجفقلی<sup>۱</sup>، سیدمحسن تقوی<sup>۲\*</sup> و میلاد آیینی<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۰۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۵

#### چکیده

طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰، ۲۴ جدایه باکتری از درختان گردو آلوده به بلایت باکتریایی از استان‌های فارس و لرستان جداسازی شد. به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و REP انجام گردید. سوبه‌های مورد بررسی، گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، قادر به هیدرولیز آسکولین، تولید H<sub>2</sub>S از سیستئین و استفاده از قندهای گلوکز، سوکروز، دی‌مانوز و دی‌سوربیتول بودند. جدایه‌ها تفاوت کمی در هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز نشاسته، تحمل به نمک‌طعام ۳ درصد و استفاده از قند آل‌آل‌آل‌آل داشتند. همچنین آزمون‌های بیماری‌زایی و آنتی‌بیوگرام روی جدایه‌ها انجام شد. براساس خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی و تکثیر قطعه ۴۱۳ جفت بازی با آغازگر rev\_seq در واکنش PCR، جدایه‌های مذکور به‌عنوان *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* تشخیص داده شدند. بر پایه آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها تقریباً همگن و بیش از ۸۷ درصد شباهت داشتند. سوبه‌ها براساس rep-PCR با استفاده از آغازگرهای مذکور در دو گروه اصلی قرار گرفتند. در مجموع سوبه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی مشابه بودند و استفاده از rep-PCR نتوانست سوبه‌ها را براساس منشاء جغرافیایی از هم تفکیک نماید. همچنین این اولین گزارش از بیماری باکتریایی بلایت گردو از استان فارس است.

واژه‌های کلیدی: بلایت باکتریایی، فنوتیپ، ژنوتیپ

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز

۲. استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز

۳. دانشجوی دوره دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان، همدان

Email: mtaghavi@shirazu.ac.ir

\* نویسنده مسوول

## مقدمه

بیماری بلایت گردو نخستین بار در دنیا توسط بریتل گزارش گردید. سپس پیرس باکتری عامل بیماری را جداسازی و اثبات بیماری‌زایی نمود و نام آن را *Pseudomonas juglandis* نامید، پیرس (Pierce, 1901). در سال‌های بعد بر روی طبقه‌بندی آن مطالعات بیشتری انجام شد و محققین مختلف آن را *Phytophthora juglandis*, *Bacterium juglandis* و *Xanthomonas juglandis* و *Xanthomonas campestris* pv. *Xanthomonas juglandis* نامیدند، اسمیت، برگی و همکاران؛ دوسون؛ دای و همکاران (Smith, 1905; Bergey et al., 1930; Dowson, 1939; Dye et al., 1980). در نهایت واتورین آن را در گونه جدید *X. arboricola* و به‌عنوان پاتووار *Juglandis* قرار داد. عامل بیماری یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی اجباری، دارای یک تاژک قطبی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و قادر به تولید زانتامونادین می‌باشد که سبب ایجاد بیماری بلایت گردو می‌شود. در این بیماری قسمت‌های مختلف درخت مانند جوانه، برگ، دم‌برگ، دمگل، سرشاخه، شاتون، مادگی، میوه‌چه و مغز گردو مورد حمله قرار می‌گیرد و در آلودگی‌های شدید سبب خسارت ۵۰ درصدی محصول می‌گردد، گراسین و همکاران؛ بلیساریو و همکاران (Garcin et al., 2001; Belisario, et al., 1997). علائم بیماری در برگ‌ها، ابتدا به‌صورت نقاط کوچک آب‌سوخته می‌باشد، که پس از توسعه، ایجاد لکه‌های ۲-۴ میلی‌متری بافت مرده زوایه‌ای می‌کند، آرک (Ark, 1944) و چنانچه آلودگی در برگ‌های در حال رشد اتفاق بیافتد سبب بدشکلی برگ می‌گردد (گل‌محمدی و همکاران، ۱۳۸۱). علائم روی سرشاخه‌ها، ابتدا به‌صورت نقاط بسیار ریز نیمه شفاف و آب‌سوخته است که با توسعه بیماری حالت شانکر می‌گیرند. اندام‌های جوان و در حال رشد به این بیماری حساس و با بالغ شدن نسبت به این بیماری مقاوم‌تر می‌شوند، (بلیساریو و همکاران، 1997). ارقام مختلف گردو نسبت به بیماری بلایت باکتریایی از نظر حساسیت متفاوت می‌باشند، اما هیچ‌گونه ارقام مقاومی یافت نشده است، تامپونی و دوناتی (Tamponi and Donati, 1990).

گل‌محمدی و همکاران (۱۳۸۱) با بررسی بیماری بلایت باکتریایی و پوسیدگی مغز گردو (استان‌های مرکزی و شمالی کشور) و تعیین تعدادی از خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی و الکتروفورز پروتئین‌های سلولی، نشان دادند که این جدایه‌ها از لحاظ این خصوصیات همگن می‌باشند. همچنین اسکورتیچینی و همکاران (Scortichini et al., 2001) از درختان گردو، کلکسیون‌های کشت بین‌المللی و آزمایشگاه‌های بیماری‌های

گیاهی از سراسر جهان ۶۱ جدایه باکتریایی *X. arboricola* pv. *juglandis* جمع‌آوری و به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی از مجموعه آغازگرهای ERIC، BOX و REP استفاده نمودند. در این بررسی آنالیزهای خوشه‌ای وجود سه گروه بزرگ از استرین‌ها را نشان دادند که دو گروه اول دارای ۸۵ درصد شباهت ژنتیکی بودند. درحالی‌که گروه سوم ۷۸ درصد شباهت با دو گروه دیگر را نشان داد، اسکورتیچینی و همکاران (2001). با توجه به اهمیت اقتصادی و مشاهده علائم مشابه با بیماری بلایت گردو در استان‌های فارس و لرستان، هدف از این تحقیق ردیابی، تشخیص و بررسی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی عامل بیماری می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و جداسازی

طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰، از مناطق مختلف استان‌های فارس و لرستان نمونه‌های مشکوک به آلودگی بلایت گردو از قسمت‌های برگ، میوه و شاخه جمع‌آوری گردید. به‌منظور جداسازی عامل بیماری، اندام‌های آلوده با مایع سفیدکننده تجارتي ۱۰٪ ضد عفونی و در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. سپس از قطعات آلوده در آب مقطر سوسپانسیون تهیه و یک لوپ از آن روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) به روش خطی کشت گردید. پرگنه‌ها در محیط کشت NA خالص و در نهایت تعداد ۲۴ جدایه زانتوموناس جدا گردید. همچنین از یک جدایه استاندارد ایتالیا و یک جدایه از زنجان به‌عنوان شاهد در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

### آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژی

۲۶ جدایه براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژی و خصوصیات تغذیه‌ای زیر با هم مقایسه شدند. واکنش گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی، فوق حساسیت در توتون، آرژنین دهیدرولاز، تولید رنگ زرد روی YDC، هیدرولیز آسکولین، تولید گاز  $H_2S$  از سیستئین، تولید رنگدانه فلورسنت، اوره‌از تولید اندول، لوان، هیدرولیز توئین ۸۰ (لیپاز)، رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تحمل نمک طعام ۲، ۲/۵ و ۳ درصد، استفاده از قندها، اسیدهای آمینه و الکل‌های آلی در محیط پایه Ayers شامل گلوکز، سوکروز، سلوبیوز، دی‌ریبوز، دی‌سوربیتول، ال رامنوز، دی مانیتول، دی مانوز، ال والین، ال هیستیدین، ال سرین، دی آلانین، ال آرآبینوز، ال ایزولوسین، ال آسپارژین، ال آلانین، دی ملی‌بیوز، ال آرآبیتول، شاد و

جدول ۱: مشخصات جدایه‌های عامل بلایت گردو در استان های فارس و لرستان

Table 1: Characteristics of walnut bacterial blight strains from Fars and Lorestan provinces

بافت گیاهی Plant	استان Province	محل جمع‌آوری Region collect	کد جدایه Strain code
برگ Leaf	لرستان Lorestan	الشتار Alashtar	A1
برگ Leaf	لرستان Lorestan	الشتار Alashtar	A2
برگ Leaf	لرستان Lorestan	الشتار Alashtar	A3
میوه Fruit	لرستان Lorestan	الشتار Alashtar	A4
برگ Leaf	لرستان Lorestan	خرم آباد Khorramabad	K1
میوه fruit	لرستان Lorestan	خرم آباد Khorramabad	K2
میوه fruit	لرستان Lorestan	خرم آباد Khorramabad	K3
برگ Leaf	لرستان Lorestan	بروجرد Borujerd	B1
برگ Leaf	لرستان Lorestan	بروجرد Borujerd	B2
برگ Leaf	لرستان Lorestan	نورآباد Norabad	N1
میوه fruit	لرستان Lorestan	نورآباد Noor Abad	N2
میوه fruit	لرستان Lorestan	نورآباد Noor Abad	N3
برگ Leaf	لرستان Lorestan	دورود Dorood	D1
میوه fruit	لرستان Lorestan	دورود Dorood	D2
برگ Leaf	فارس Fars	سپیدان Sepidan	S1
میوه fruit	فارس Fars	سپیدان Sepidan	S2
میوه fruit	فارس Fars	بوانات Bavanat	Ba1
میوه fruit	فارس Fars	بوانات Bavanat	Ba2
میوه fruit	فارس Fars	بوانات Bavanat	Ba3
برگ Leaf	فارس Fars	بوانات Bavanat	Ba4
برگ Leaf	فارس Fars	اقلید Eqlid	E1
برگ Leaf	فارس Fars	اقلید Eqlid	E3
برگ Leaf	فارس Fars	قلات Ghalat	Gh
برگ Leaf	فارس Fars	بهشت گمشده Beheshte gomshodeh	Be
		ایتالیا (اهدایی دکتر معرفت)	IT
	زنجان Zanjan	زنجان (اهدایی دکتر معرفت)	Za

## آزمون آنتی‌بیوگرام

به‌منظور تعیین میزان حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، از دیسک‌های تجارتي آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون  $10^8$  cfu/ml از جدایه‌ها تهیه و با میله‌ای L شکل به‌طور یکنواخت روی محیط کشت NA پخش گردید. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به کمک یک انبرک سترون به فاصله حدود ۳ سانتی‌متر از یکدیگر، بر روی محیط‌های کشت حاوی باکتری قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت نتایج براساس وجود یا عدم وجود هاله بازدارنده (Inhibition zone) و قطر هاله بازدارنده ثبت گردید (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این آزمون عبارت بودند از: آمیکاسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، وانکومایسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، سفنازیدیم (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، توبرامایسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، نیتروفورانتوئین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، پنی‌سیلین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، سفالوسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، کانامایسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، کلوکساسیلین (۱ میلی‌گرم در دیسک)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، آموکسی‌سیلین (۲۵ میلی‌گرم در دیسک)، اوکساسیلین (۱ میلی‌گرم در دیسک)، نورفلوکساسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میلی‌گرم در دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی‌گرم در دیسک) و تتراسایکلین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک).

## آزمون بیماری‌زایی

این آزمون روی میوه و نهال‌های یکساله گردو در گلخانه انجام شد، ابتدا سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^8$  cfu/ml تهیه گردید. سپس با سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و یک قطره از سوسپانسیون باکتری روی آن قرار داده شد. به‌منظور تأمین رطوبت گلدان‌ها، از کیسه‌های پلاستیکی به‌مدت ۷۲ ساعت استفاده شد، سپس گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از سه هفته نهال‌های مایه‌زنی شده مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین آزمون بیماری‌زایی روی میوه گردو در شرایط آزمایشگاه انجام گرفت. در این آزمون ابتدا سطح میوه‌ها به‌وسیله الکل اتیلیک ضدعفونی و میوه‌ها داخل ظرف پلاستیکی شفاف قرار داده شدند. سپس روی میوه‌ها با سوزن زخم‌هایی ایجاد گردید و یک قطره از سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^6$  cfu/ml روی میوه‌ها قرار داده شد. به‌منظور تأمین رطوبت داخل ظرف پنبه‌های سترون مرطوب قرار داده و ظرف داخل کیسه پلاستیکی در دمای اتاق

به‌مدت ۱۰ روز نگهداری شد.

## تشخیص باکتری Xaj با آغازگرهای اختصاصی

برای تشخیص نهایی باکتری Xaj از آغازگر rev\_seq

5-AGCATGACGTCATCGTCT-3

5-CAATTATTTAGGGACTCG-3

(زاده محمد و معرفت، ۱۳۸۹) طراحی شده براساس ژن 16S

rRNA استفاده شد. یک لوپ از پرگنه‌های باکتری روی

محیط کشت NA برداشته شد و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر

سترون حل گردید. به‌منظور استخراج DNA، نمونه‌ها در یک

ظرف حاوی آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله

به‌مدت چند دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در

۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه دقیقه سانتریفیوژ و از فاز

رویی برای انجام آزمون PCR استفاده گردید.

برای انجام آزمون PCR محلول پایه ۲۵ میکرولیتر برای هر

واکنش تهیه گردید که شامل تمامی مواد مورد نیاز برای

واکنش PCR بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه

حرارتي شامل واسرشت‌سازی مقدماتی ۴ دقیقه در  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۳۵

چرخه با واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در  $93^{\circ}\text{C}$ ، اتصال ۳۰ ثانیه در

$62^{\circ}\text{C}$ ، سنتز یک دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  و سنتز نهایی ۱۰ دقیقه در

$72^{\circ}\text{C}$  صورت گرفت. مواد و مقدار مورد استفاده برای واکنش

PCR، شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)،

۱/۵ میکرولیتر  $\text{MgCl}_2$  (2.5mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs

(10mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (10U/ )

( $\mu\text{l}$ )، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت ( $10\mu\text{M}$ )، ۱ میکرولیتر آغازگر

برگشت ( $10\mu\text{M}$ )، ۳ میکرولیتر DNA و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب

سترون.

## آزمون rep-PCR

جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری Xaj از روش

rep-PCR و آغازگرهای REP1R/REP2I، ERIC1R/ERIC2 و

BOXA1R برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده

استفاده گردید ورسالوویک و همکاران (Versalovic et al., 1991).

ترادف آغازگرهای مورد استفاده برای روش rep-PCR

به‌ترتیب در جدول ۱ آورده شده است. چرخه حرارتي واکنش

rep-PCR شامل دو چرخه واسرشت‌سازی اولیه در  $93^{\circ}\text{C}$

به‌مدت ۱۲۰ و ۲ ثانیه، ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل سه

مرحله واسرشت‌سازی در  $92^{\circ}\text{C}$  به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال

آغازگرهای Rep، Eric و Box به‌ترتیب در  $42^{\circ}\text{C}$ ،  $53^{\circ}\text{C}$  و

$52^{\circ}\text{C}$  و سنتز در  $72^{\circ}\text{C}$  به‌مدت ۸ دقیقه و یک چرخه نهایی

سنتز در  $72^{\circ}\text{C}$  به‌مدت ۸ دقیقه بود. مواد لازم برای انجام

Unweighted Pair-Group method using (UPGMA) Arithemtic Average و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده گردید. استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر متداول‌تر است، زیرا خصوصیات همه اعضای مربوط به دو کلاستر را پوشش می‌دهد. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، براساس کلیه خصوصیات ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید.

### نتایج

از درختان گردو که علائم بلایت را نشان می‌دادند، ۲۴ جدایه گرم منفی، دارای پرگنه‌های زرد، صاف، مدور، براق با حاشیه منظم روی محیط‌کشت NA جداسازی گردید. سایر خصوصیات فنوتیپی در جدول ۲ آمده است.

واکنش rep-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر عبارتند از: ۰/۸۵ میکرولیتر (50mM) MgCl<sub>2</sub>؛ ۲/۶ میکرولیتر 10X PCR buffer؛ ۰/۵ میکرولیتر (10μM) dNTPs؛ ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA Polymerase (5U/μl)؛ ۱/۲ میکرولیتر آغازگر رفت (10μM)؛ ۱/۲ میکرولیتر آغازگر برگشت (10μM)؛ ۲/۵ میکرولیتر DNA و ۱۵/۷۵ میکرولیتر آب مقطر سترون.

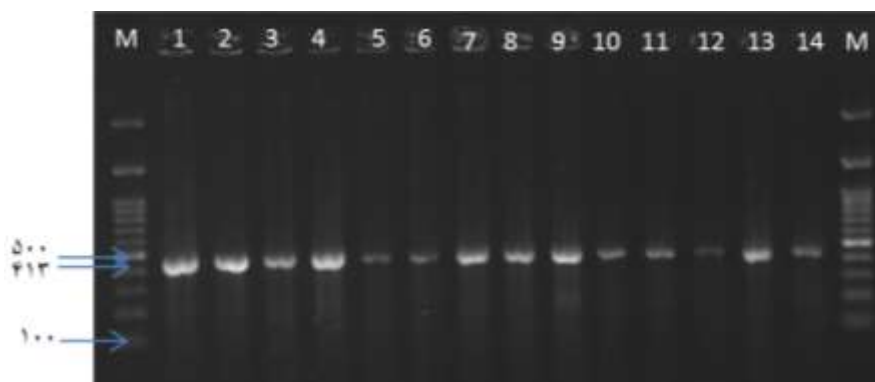
### آنالیز داده‌های ژنوتیپی

با استفاده از نرم‌افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Ntsys-pc 2.02) ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید، رولف (Rohlf, 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم‌وجود باند در ژل مشخص شد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش مراتبی (Hierachical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش

جدول ۲: توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی در rep-PCR

Table 2: Primer sequences used in rep-PCR

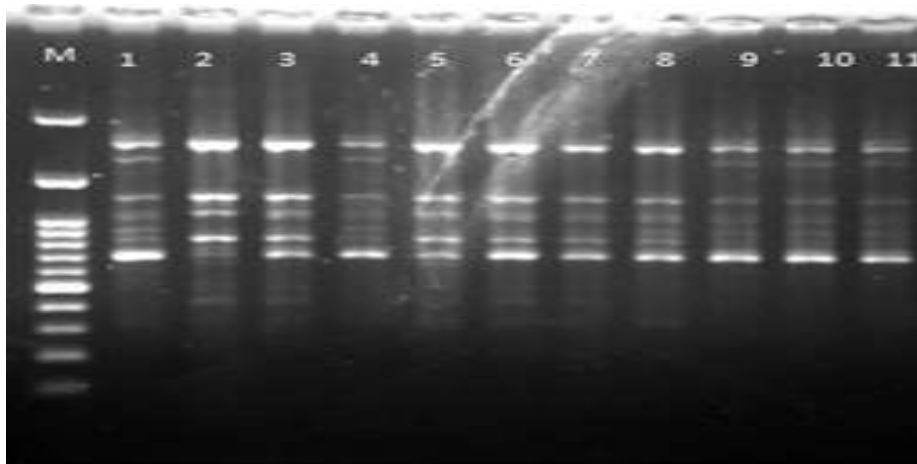
آغازگر Primer	توالی (5'-3') Sequence	منبع Source
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
REP1R	IIIICGICGICATCIGGC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP2I	ICGICTTATCIGGCCTAC	Versalovic <i>et al.</i> , 1991



شکل ۱: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* جدا شده از استان‌های فارس و لرستان با آغازگر

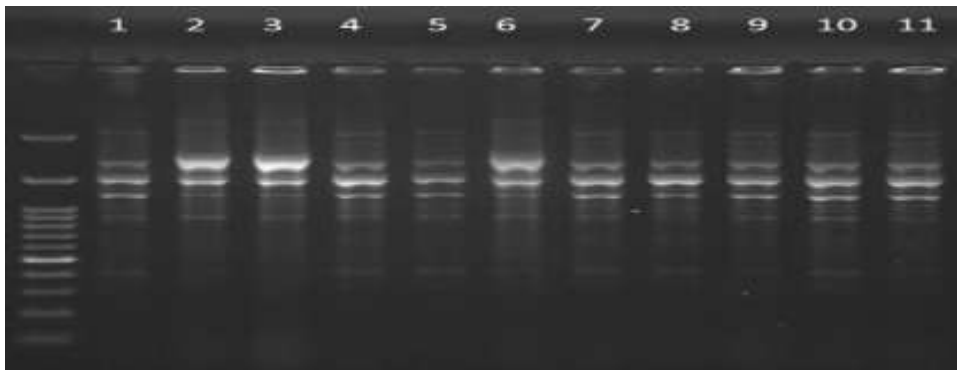
اختصاصی rev\_seq

Fig. 1: Agarose gel electrophoresis of PCR-products of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains isolated from Fars and Lorestan provinces with specific primer rev\_seq



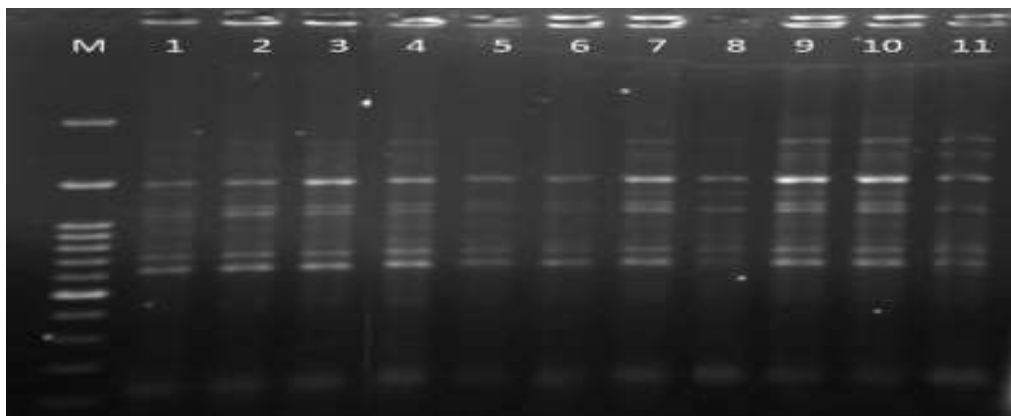
شکل ۲: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر ERIC  
 ۱: E1، ۲: Gh، ۳: Be، ۴: A4، ۵: K2، ۶: E3، ۷: S1، ۸: E2، ۹: A1، ۱۰: A2، ۱۱: K1، M: ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 2: ERIC-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *Juglandis* strains  
 1: E1, 2: Gh, 3: Be, 4: A4, 5: k2, 6: E3, 7: S1, 8: E2, 9: A1, 10: A2, 11: K1, M: 100 base pair



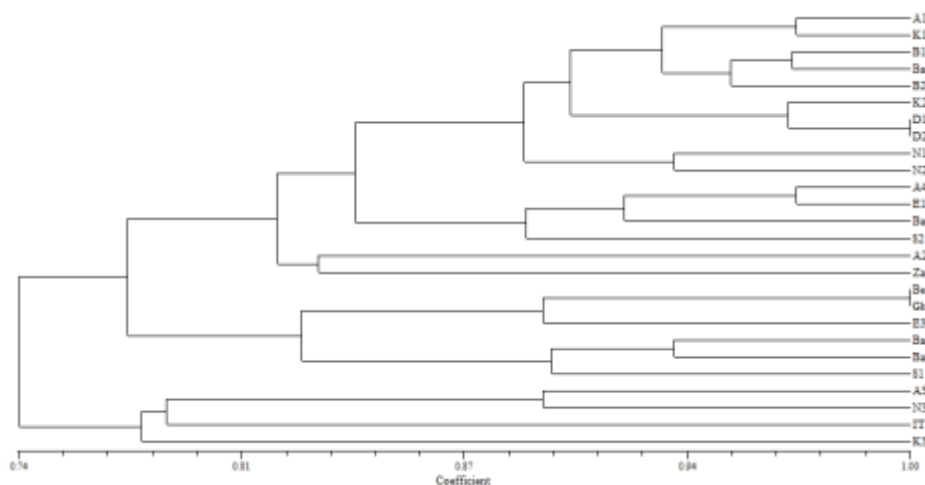
شکل ۳: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر BOX  
 ۱: Ba1، ۲: Gh1، ۳: Be، ۴: S1، ۵: Ba3، ۶: E3، ۷: E2، ۸: B2، ۹: A1، ۱۰: A3، ۱۱: B1، M: ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 3: Box-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains  
 1: Ba1, 2: Gh1, 3: Be, 4: S1, 5: Ba3, 6: E3, 7: E2, 8: B2, 9: A1, 10: A3, 11: B1, M: 100 base pair



شکل ۴: نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر REP  
 ۱: A2، ۲: B1، ۳: B2، ۴: D1، ۵: K2، ۶: D1، ۷: Gh، ۸: E2، ۹: E1، ۱۰: E3، ۱۱: Be، M: ۱۰۰ جفت بازی

Fig. 4: REP-PCR fingerprint patterns of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains  
 1: A2, 2: B1, 3: B2, 4: D1, 5: K2, 6: D1, 7: Gh, 8: E2, 9: E1, 10: E3, 11: Be, M: 100 base pair



شکل ۵: دندروگرام جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* براساس rep-PCR با آغازگرهای BOX، ERIC و REP  
 Fig. 5: Combined dendrogram of *X. arboricola* pv. *juglandis* strains based on rep-PCR

مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات بین نواحی حفاظت شده با آغازگرهای ERIC، Box و Rep به ترتیب در شکل‌های ۱-۳، ۲-۳ و ۳-۳ نشان داده شده است.

با استفاده از نتایج حاصل از الکتروفورز محصول آغازگرهای واکنش rep-PCR، دندروگرام مربوط به جدایه‌های *Xaj* با استفاده از ضریب تشابه جاگارد (j) رسم گردید. بر این اساس جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۴ درصد به دو گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۴)؛ که گروه اول شامل جدایه‌های A<sub>2</sub>، A<sub>4</sub>، K<sub>1</sub>، K<sub>2</sub>، B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، N<sub>1</sub>، N<sub>2</sub>، D<sub>1</sub>، D<sub>2</sub>، Z<sub>A</sub>، E<sub>1</sub>، E<sub>3</sub>، B<sub>e</sub>، B<sub>a</sub><sub>1</sub>، B<sub>a</sub><sub>2</sub>، B<sub>a</sub><sub>3</sub>، B<sub>a</sub><sub>4</sub>، G<sub>b</sub>، S<sub>1</sub> و S<sub>2</sub> و گروه دوم شامل A<sub>3</sub>، K<sub>3</sub>، N<sub>3</sub> و IT بودند.

### بحث

در این تحقیق خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی جدایه‌های عامل بلایت گردو مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت که از درختان گردو دارای علائم جداسازی شدند، براساس آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی مانند ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، تولید H<sub>2</sub>S از سیستئین، رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، عدم تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت KB، عدم پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط کشت EMB، تولید پرگنه‌های لعابی و گنبدی روی محیط کشت‌های NAS و SPA و استفاده از قندها و اسیدآمینه‌های گلوکز، سوکروز، سلوبیوز، دی‌ریبوز، دی‌مانوز، ال‌سرین، ال‌آرابینوز، ال‌آسپارژین، دی‌ملی‌بیوز، ال‌آرابیتول و عدم استفاده از دی‌سوربیتول، ال‌رامنوز، دی‌مانیتول، ال‌والین، ال‌هیستیدین، دی‌آلانین، ال‌ایزولوسین و دی‌آلانین به‌عنوان پتووار *Xaj* تشخیص داده شدند، گاردان و همکاران؛ شاد و همکاران (Gardan et al., )

### آزمون بیماری‌زایی

در آزمون اثبات بیماری‌زایی، علائم سه هفته بعد از مایه‌زنی به صورت نقاط نکروزه با حاشیه زرد بر روی برگ‌ها مشاهده گردید. به‌منظور اجرای اصول کخ، بعد از مایه‌زنی از برگ‌های دارای علائم نمونه‌برداری و جداسازی مجدد باکتری صورت گرفت. همچنین در آزمون بیماری‌زایی روی میوه، میوه‌ها بعد از ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند که علائم روی میوه‌ها به‌صورت سیاه‌شدگی میوه و خروج تراوشات سفید رنگ از میوه مشاهده گردید.

### آزمون آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این آزمون و چگونگی واکنش جدایه‌های مختلف باکتری، در جدول ۳ ثبت شده است. مبنای نیمه‌مقاوم و حساس بودن جدایه‌ها براساس قطر هاله بازدارنده بود، به‌طوری‌که جدایه‌هایی با قطر هاله بازدارنده بین ۶-۱ میلی‌متر در گروه نیمه مقاوم و جدایه‌هایی که قطر هاله آن‌ها بیشتر از ۶ میلی‌متر بود در گروه حساس طبقه‌بندی شدند.

### خصوصیات ژنوتیپی

#### ردیابی *Xaj* عامل بلایت گردو با آغازگرهای اختصاصی

جدایه‌های نماینده تکثیر شده با آغازگر اختصاصی rev\_seq که براساس خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری‌شناسی به‌عنوان *Xaj* تشخیص داده شده بودند، در واکنش PCR قطعه قابل انتظار ۴۱۳ جفت بازی را تولید کردند (شکل ۲).

#### rep-PCR - ۲-۴-۴

۲۶ جدایه زانتوموناس عامل بلایت گردو در آزمون rep-PCR

نتایج آزمون‌های فنوتیپی نشان داد که کلیه سویه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی نسبتاً یکنواخت بوده و تنها در مواردی، اختلافات اندک در خصوصیات تغذیه‌ای و بیوشیمیایی آن‌ها مشاهده گردید که نتایج این تحقیق با نتایج گل‌محمدی و همکاران مشابهت داشت. از نظر آزمون فنوتیپی جدایه K<sub>3</sub> در هیدرولیز نشاسته و استفاده از قند ال-آلانیل با جدایه‌های دیگر تفاوت داشت. همچنین جدایه IT در استفاده از قند ال-آلانیل و تحمل نمک طعام نسبت به جدایه‌های دیگر متفاوت بود.

در آزمون حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تقریباً حساسیت و مقاومت اکثر جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مشابه بود که می‌تواند ناشی از عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه عدم ایجاد فشار انتخاب در کنترل بیماری مذکور باشد. آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، کانامایسین، نورفلوکساسین، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین دارای بیشترین اثر بازدارندگی بودند که می‌توان در صورت مقرون به صرفه بودن آن‌ها از لحاظ اقتصادی، با مدیریت صحیح در تناوب با سموم مسی استفاده کردند.

آزمون اثبات بیماری‌زایی روی نهال و میوه گردو انجام شد که برای طبقه‌بندی پتووارهای باکتریایی بیمارگر از اهمیت بالایی برخوردار است، چون این طبقه‌بندی براساس بیماری‌زایی روی یک میزبان یا گروهی از میزبان‌های خاص می‌باشد. در عین حال خصوصیت بیماری‌زایی به‌عنوان یک فنوتیپ مشخص به تنهایی برای تفکیک و تمایز پتووارها کافی نیست و تحقیقات

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۲-۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.

مختلف روی پتووارهای دیگر گونه‌های زانتوموناس از قبیل X. citri نشان داد، که تنوع ژنتیکی درون پتووارها وجود دارد، نگوک و همکاران (Ngoc et al., 2010).

rep-PCR از دیگر تکنیک‌های ایجاد اثر انگشت ژنتیکی و بررسی تنوع در میان جمعیت‌ها است، که نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر، سریع‌تر و مناسب‌تر است، لووس و همکاران (Louws et al., 1994). همچنین براساس آنالیز داده‌های REP-PCR، جدایه‌های جمع‌آوری شده به دو گروه اصلی تقسیم شدند، که با نتایج حاصل از خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تطابق داشت. همچنین گروه‌بندی انجام شده توسط آغازگرهای BOX، ERIC و REP توانست به خوبی تنوع را بین جدایه‌های مورد بررسی نشان دهد، که با نتایج اسکورتیچینی و همکاران (2001) مطابقت داشت. طبق این تحقیق مشخص شد، این تکنیک برای تفکیک استرین‌های مختلف پتووار Xaj مناسب می‌باشد. البته بسیاری از تحقیقات دیگر که در زمینه بررسی تنوع درون استرین‌های دیگر پتووار باکتریایی انجام شده بود، نیز مشخص کرده بود، که این تکنیک برای بررسی تنوع در حد پتووار کارا است. تنوع موجود در بین جدایه‌های این بیمارگر را می‌توان به تنوع در ژرم‌پلاسم گردو و منشاء جغرافیایی مختلف نسبت داد. به‌طور کلی میان اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها در روش rep-PCR با منطقه نمونه‌برداری (شهرستان‌های استان فارس و لرستان) ارتباط خاصی مشاهده نشد و استفاده از این آغازگرها نتوانستند جدایه‌ها را از نظر منشاء جغرافیایی تفکیک نماید.