تنوع فنوتیپی و ژنتیکی استرین‌های *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار در استان سمنان

Phenotypic and Genotypic Diversity of *Erwinia amylovora* Strains, Causing Fire Blight Disease of Pome Fruits in Semnan Province

فرخنده امتی[۱]، ابوالقاسم قاسمی[۲] و مسعود ذاکر[۳*]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۳

چکیده

بیماری آتشک با عامل *Erwinia amylovora* یکی از مهمترین بیماری‌های خسارت‌زای درختان میوه دانه‌دار به‌ویژه گلابی و به در استان سمنان است. در طی سال‌های ۸۷ و ۸۸ تعداد ۸۰ استرین *E. amylovora* از میزبان‌های سیب، گلابی، به و رز از مناطق مختلف استان سمنان جداسازی شد و تعداد ۵۰ استرین از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، ژنتیکی و احتمال مقاومت به استرپتومایسین و اکسی کلرور مس مورد بررسی قرار گرفتند. براساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی استرین‌های مورد بررسی به‌عنوان گونه *E. amylovora* شناسایی شدند. استرین‌های مذکور گرم منفی، بی‌هوازی اجباری، لوان مثبت و قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی برگ‌های توتون بوده و در محیط King's B رنگدانه فلورسنت ایجاد نکردند. براساس خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و مناطق جغرافیایی تعداد هشت استرین برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شد که در انگشت‌نگاری به روش rep-PCR با آغازگرهای ERIC و BOX تمامی جدایه‌ها با جدایه مرجع ATCC 49946 هموژن و یکسان بودند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مبنی بر عدم ورود استرین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و اکسی‌کلرور مس به استان سمنان می‌توان جهت مدیریت این بیماری کماکان از ترکیبات شیمیایی باکتری‌کش موجود در باغات استان استفاده نمود و یکنواختی استرین‌ها کمک خواهد نمود که از یک رویه یکسان در تهیه ارقام مقاوم، پیش آگاهی بیماری و مدیریت تلفیقی آن سود جست.

واژه‌های کلیدی: سیب، گلابی، به، آنتی‌بیوتیک، مقاومت

۱و ۳. مربیان پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، شاهرود

۲. استادیار پژوهش، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، تهران

*: نویسنده مسوول Email: masoudzaker35@gmail.com

مقدمه

بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در خانواده رزاسه می‌باشد که توسط باکتری *Erwinia amylovora* (Burill) winslow *et al.*,1920, ایجاد می‌گردد. بیماری آتشک سیب، گلابی و به در سال ۱۹۸۵ از کشور ترکیه گزارش شد *ونسته* (Vanneste, 2000) که احتمالاً در سال ۱۹۹۰ از شرق ترکیه وارد ایران شده است. وجود بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۰ از برغان کرج از روی درختان گلابی گزارش شد *ذاکری و شریف نبی* (Zakeri and Sharifnabi, 1991). اولین آلودگی‌های بیماری در سال ۱۳۷۳ در قزوین و سلماس به وقوع پیوست *مزارعی* و همکاران (Mazarei *et al*., 1994) و سپس بین سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۷۸ موجب نابودی بسیاری از باغ‌های حساس گلابی و به در استان‌های تهران و قزوین شد. علی‌رغم تمهیدات قرنطینه‌ای انجام شده جهت جلوگیری از گسترش بیماری در کشور، آتشک در سال ۱۳۸۳ از استان‌های خراسان، گیلان و فارس گزارش گردید *علی و نیک نژاد کاظم پور؛ سهند پور و قاسمی؛ ظهور و رحمانی مقدم* (Ali and Niknejad-Kazempour, 2004; Sahandpour and Ghasemi, 2004; Zohur and Rahmani-Moghadam, 2004). هم اکنون بیماری آتشک در بسیاری از مناطق دیگر کشور از جمله استان‌های مرکزی، سمنان، اردبیل، زنجان، کردستان، قم، لرستان، کرمانشاه و اصفهان وجود دارد.

از نظر اقتصادی بیماری آتشک سیب و گلابی و به یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها است که در شمال غرب آمریکا در سال ۱۹۹۸ میزان ۶۸ میلیون دلار و در نیوزلند ده میلیون دلار زیان وارد و در ایتالیا ۵۰۰۰۰۰ اصله درخت میوه را نابود کرده است. اهمیت اقتصادی بیماری آتشک به‌دلیل دامنه تخریب، شیوه انتشار و بیماری‌زایی باکتری عامل بیماری، در دسترس نبودن ترکیب مؤثر و درمان‌کننده قابل توجه می‌باشد. بیماری آتشک درختان سیب، گلابی و به در شرایط اپیدمی خسارتی معادل کل محصول دارد ولی مطابق گزارش‌های منابع مختلف سالیانه بین ۲۰ تا ۸۰ درصد خسارت وارد می‌کند. استرین‌های باکتری *E. amylovora* از نظر شدت بیماری‌زایی، دوام و بقاء و مقاومت به استرپتومایسین دارای تنوع هستند و در این رابطه مقاومت به استرپتومایسین در بخش‌هایی از ایالات مختلف آمریکا مشاهده شده است *چیو و جونز؛ لوپز* و همکاران؛ *شروت* و همکاران (Chiou and Jones, 1991; Loper *et al*., 1991; Schroth *et al*., 1971).

در سال ۱۹۹۹ یک گونه جدید باکتری به نام *Erwinia pyrifoliae* به‌عنوان عامل نکروز سرشاخه‌های گلابی آسیایی (*Pyrus pyrifolia* Nakai) از کره جنوبی گزارش شد *کیم* و همکاران (Kim *et al*., 1999). این گونه جدید توانایی آلوده سازی تمام ارقام سیب را نداشته و تنها روی تعداد معدودی از آنها بیماری‌زا می‌باشد. استرین‌های این گونه با روش RAPD-PCR از همدیگر قابل تفکیک هستند *مومل* و همکاران (Momol *et al*., 1997). استرین های *E. amylovora* جدا شده از مناطق مختلف جغرافیایی، از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و الگوی پروتئینی یکسان بوده ولی بر مبنای درجه حساسیت به استرپتومایسین به سه گروه تقسیم می‌شوند *مک مانوس و جونز* (McManus and Jones, 1995). تقریباً تمام استرین‌ها حامل پلاسمیدی به نام PEA 29 بوده که تشخیص و ردیابی آنها را توسط روش PCR ممکن می‌سازد. گزارش‌هایی وجود دارد که استرین‌های باکتری عامل بیماری آتشک تخصص میزبانی نداشته و استرین‌های جدا شده از سیب قادرند غیر از گلابی و سیب، درختان جنس *Prunus* را آلوده سازند *موهان و تامسون* (Mohan and Thomson, 1996). استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از تمشک قادر به بیماری‌زایی روی سیب و گلابی نبوده و نیز استرین‌های جدا شده از گلابی آسیایی از Hokkaido ژاپن درجاتی از تخصص میزبانی را نشان داده‌اند. در مجموع باکتری عامل بیماری آتشک سیب و گلابی و به دارای دامنه میزبانی گسترده بوده و روی حدود ۲۰۰ گونه از ۴۰ جنس خانواده Rosaceae بیماری ایجاد می‌نماید که تعدادی از این میزبان‌ها به‌صورت مصنوعی آلوده شده‌اند ولی گونه‌های جنس *Rubus* و *Prunus salicina* به‌طور طبیعی آلوده شده‌اند *وندرزوت و کیل* (Van der Zwet and Keil, 1979). تاکنون هیچ بیوواری بر مبنای ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از *E. amylovora* گزارش نشده است. بر اساس گزارش *افیونیان* و همکاران (Afunian *et al*., 2000) استرین‌های به‌دست آمده عامل این بیماری در ایران از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، بیماری‌زایی و الگوی پروتئینی دارای ویژگی‌های یکسان بوده‌اند. تلاش‌های زیادی جهت یافتن تفاوت در بیماری‌زایی و دامنه میزبانی استرین‌های باکتری عامل آتشک صورت گرفته است از جمله *استار* و همکاران (Starr *et al*., 1951) برای استرین‌های بیماری‌زای تمشک نام *E. amylovora* f. sp. *Rubi* را پیشنهاد کردند که غیر از این مورد تاکنون هیچ گزارشی دال بر وجود سطوح زیر گونه‌ای از باکتری دیده نشده است. استرین‌های این باکتری از نظر شدت بیماری‌زایی، دوام و بقاء و مقاومت به استرپتومایسین دارای تنوع هستند و در برخی از کشورهای خاورمیانه از جمله فلسطین اشغالی نیز مقاومت به استرپتومایسین مشاهده شده

است *مانولیس* و همکاران (Manulis *et al.*, 1999). در این تحقیق تنوع فنوتیپی، ژنتیکی و بیماری‌زایی استرین‌ها و نیز احتمال ورود استرین‌های مقاوم به استرپتومایسین به استان مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت وجود تنوع، راه‌کارهای مناسب جهت کاهش خسارت آن مدنظر قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری عامل بیماری

در فصول بهار و تابستان از مناطق مختلف استان سمنان بازدید به‌عمل آمده و نمونه‌های برگ، گل، میوه و شاخه‌های درختان سیب، گلابی، به و رز که دارای علائم بیماری شامل سوختگی گل، میوه، برگ، سرشاخه‌ها و شانکر تنه بودند جمع‌آوری و با ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا در زیر شیر آب شستشو داده شدند، سپس قطعه کوچکی از بافت آلوده در تشتک پتری حاوی آب مقطر با اسکالپل خرد و پس از ده دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک لوپ از آن روی محیط آگار غذایی (Nutrient agar) حاوی پنج درصد ساکارز (NAS) مخطط شد. تشتک‌های پتری به‌مدت دو روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس کلنی‌های گرد و برجسته لوان مثبت انتخاب و روی محیط King`s B تکثیر شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌ها و تعیین حساسیت استرین‌ها به استرپتومایسین

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های خالص براساس روش‌های ذیل انجام گردید:

واکنش گرم با استفاده از روش حلالیت در KOH سه درصد *سوسلو* و همکاران (Suslow *et al.*, 1982). آزمون رشد هوازی/ بی‌هوازی به روش *هیو و لیفسون* (Hugh and Leifson, 1953)، آزمون فوق حساسیت در توتون به روش *کلمنت* و همکاران (Klement *et al.*, 1963)، آزمون آرجی‌نین‌دهیدرولاز با استفاده از روش *تورنلی* (Thornley, 1960). آزمون هیدرولیز توئین ۸۰ براساس روش *میثاقی و گروگان* (Misaghi and Grogan, 1969)، آزمون تولید لسیتیناز با استفاده از روش *لیلیوت و استید* (Lelliott and Stead 1987)، آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره‌ای از کلونی روی کاغذ صافی آغشته به محلول ۰/۱ درصد تترامتیل پارافنیلین دی‌آمین‌دی هیدروکلراید صورت گرفت *کوواکس* (Kovacs, 1956). تولید رنگدانه فلورسنت در محیط King`s B، رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و رشد روی YDC، تولید لوان در محیط غنی از سوکروز و هیدرولیز ژلاتین، اسکولین و کازئین و نیز آزمون‌های کاتالاز، اوره از، تولید گاز H_2S از سیستئین، تولید ایندول، تولید مواد احیاء کننده از ساکارز، احیای نیترات، رشد در NaCl ۳٪ (وزن به حجم)، آزمون تولید مواد احیاءکننده از سوکروز به روش *شاد* (Schaad, 1988) و آزمون MR-VP به روش *دای* (Dye, 1968) انجام شد. در آزمون‌های استفاده از اسیدهای آمینه و آلی و تولید اسید از قندهای مختلف از محیط پایه آیر (Ayer) و غلظت ۰/۳-۰/۲ درصد هر قند یا اسید آمینه موردنظر استفاده شد (*شاد*، 1988). منابع کربنی با استفاده از روش تندال (Tyndalization) سترون شده و به محیط پایه اضافه شد و نتایج تا ۱۵ روز به‌صورت روزانه ارزیابی شد *فهی و هیوارد* (Fahy and Hayward, 1983). در تمامی مراحل این تحقیق از جدایه مرجع ATCC 49946 جداشده از سیب در رود آیلند ایالات متحده استفاده شد. تعیین حساسیت استرین‌ها به آنتی-بیوتیک‌های استرپتومایسین، اکسی تتراسایکلین و ترکیب مسی اکسی کلرور مس با پخش سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^6 سلول در میلی‌لیتر (کدورت سوسپانسیون باکتری در آب مقطر به سختی از آب مقطر خالص قابل تشخیص باشد) در محیط NAS و با استفاده از دیسک‌هایی که با محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسی کلرور مس (۳۷ درصد) آغشته شده بود، با ایجاد هاله بیش از هفت میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت *بور* و همکاران (Burr *et al.*, 1988).

مطالعه شدت بیماری‌زایی استرین‌ها

شدت بیماری‌زایی جدایه ها در برگ‌های گلابی به‌صورت شاخه بریده ارزیابی گردید. سوسپانسیون رقیقی از جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری بدون سر سرنگ در دو سمت پهنک برگ به قطر پنج میلی‌متر تزریق و پس از ۴ روز قطر ناحیه نکروزه اندازه‌گیری گردید جیمز (James, 1971).

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی

از کشت ۲۴ ساعته استرین‌ها روی محیط NA محلولی نسبتاً غلیظ در یک میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و سوسپانسیون حاصل به روش *مالوی* (Maloy, 1990) به‌مدت یک دقیقه ورتکس شد و معادل ۰/۲ حجم آن بافر نمونه اضافه و به‌مدت ۴ تا ۶ دقیقه در حمام آبی جوشانده شد سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان ۵۰ میکرولیتر از هر

نمونه پروتئین‌های محلول سلولی به چاهک‌ها در ژل ناپیوسته ۱۰ درصد پلی‌اکریل آمید با میکروپیپت بارگذاری شد و الکتروفوروز با جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل انجام گرفت، سپس ژل در محلول رنگ‌آمیزی (آب، متانول، اسید استیک به نسبت ۵۰:۵۰:۱۰ و ۰/۱ گرم کوماسی بلو-G250) روی شیکر به‌مدت ۵-۴ ساعت قرار گرفت. جهت رنگبری، ژل در محلول مشابه محلول رنگ‌آمیزی ولی بدون کوماسی بلو تا زمان وضوح باندها قرارداده شد سپس از ژل عکس گرفته شده و جهت نگهداری به محلول اسید استیک ۷٪ منتقل گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی و میزبانی *E. amylovora* به روش rep-PCR

آماده‌سازی نمونه: استرین‌های باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت روی محیط NA تکثیر شدند و سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^7 سلول در میلی‌لیتر از هر باکتری در آب مقطر تهیه گردید. از روش لیز قلیایی (Alkaline lysis) برای آزادسازی DNA استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم ۰/۰۵ مولار مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سوسپانسیون به‌مدت دو دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دستگاه Beckman Microfuge E™ سانتریفیوژ شد و محلول رویی به تیوب‌های تمیز منتقل و جهت استفاده نگهداری گردید *رادیمیکر* و همکاران (Rademaker *et al*., 1997).

انگشت‌نگاری ژنتیکی استرین‌ها و یک استرین استاندارد CCPB0273 با مارکر rep انجام شد. تنوع استرین‌های مورد نظر با یک جفت آغازگر (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ERIC 1R)، (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' ERIC 2) و آغازگر BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGAC GCTGACG-3') بررسی شد. آغازگرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد.

مقدار کل هر واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید)، ۰/۵ میکرولیتر از بازهای سازنده (dNTP) ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر Taq پلیمراز (5U/µL) به‌عنوان کاتالیزکننده سنتز زنجیره پلی-نوکلئوتیدی، ۱ میکرولیتر (۲ میکرولیتر برای BOX) از هر آغازگر ۲۰ پیکومول و ۱ میکرولیتر از DNAی تهیه شده در روش مذکور و در نهایت برای رساندن حجم هر نمونه به ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر سترون استفاده گردید. پس از مخلوط کردن کامل مواد واکنش، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD مدل MJ Research PTC قرار گرفتند. باز شدن دو رشته DNA از یکدیگر (Initial denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و چسبیدن آغازگر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و ساخته شدن رشته‌های DNA جدید در دمای ۶۵ درجه به‌مدت هشت دقیقه از روی الگو طی ۳۵ چرخه و به‌دنبال آن یک دوره ساخت نهایی در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت (*رادیمیکر*). محصول PCR پس از تولید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و روز بعد الکتروفورز انجام شد.

محصول PCR با دستگاه الکتروفورز افقی مینی‌ژل (Mini gel) مدل سیگما (Sigma) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. ابتدا ژل آگارز در بافر TBE (شامل pH= 8، EDTA= 4ml, 0.5M، Boric acid= 2.74g و Tris base= 5.4g) تهیه و برای رنگ‌آمیزی DNA به آن محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ mg/ml اضافه گردید. ماده رنگی پیشرو ۶x (حاوی گلیسرول ۶۰ درصد، برموفنول بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن سیانول FF ۰/۰۹ درصد) به نسبت ۱ به ۳ با محصول PCR مخلوط و در ژل آگارز با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. برای ارزیابی اندازه قطعات محصول rep-PCR از مارکر استاندارد 1kb استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه UVDOC مشاهده و عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

بررسی‌های انجام شده در مناطق مختلف استان نشان داد که عامل بیماری در همه مناطق اجرای این تحقیق به استثنای منطقه تاش به‌شدت فعال بوده و در تمامی باغ‌هایی که نمونه برداری در آنها انجام گرفت از همه میزبان‌های اصلی یعنی سیب، گلابی و به و میزبان غیراقتصادی شامل رز به‌راحتی جداسازی شد (جدول ۱).

در آزمون‌های فنوتیپی شباهت بسیار بالایی بین استرین‌ها مشاهده شد (جدول ۲) در بررسی‌های سایر محققین نیز تنها استرین‌های تمشک و نیز استرین‌های جدا شده از هوکایدو در یک گروه جداگانه قرار گرفتند و سایر استرین‌ها در یک گروه تمرکز داشتند (*ونسته*، 2002).

جدول ۱: وضعیت پراکنش بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار در مناطق مختلف استان سمنان و میزبانان آن

Table 1: Dispersion of fire blight of pome fruits in different localities of Semnan province and its hosts

منطقه Region	میزبان Host	منطقه Region	میزبان Host
شاهرود (Shahrood)		دامغان (Damghan)	
یونس آباد (Yonesabad)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)	آهوانو (Ahovano)	سیب، به (Apple, Quince)
کارخانه قند (Sugar factory)	گلابی، به، رز (Pear, Quince, Rose)	آستانه (Astaneh)	به (Quince)
دیزج (Dizag)	گلابی، به (Pear, Quince)	بسطام (Bastam)	
رویان (Royan)	به (Quince)	چوب بری (Choob-bori)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)
قلعه نو خالصه (Ghaleno khalese)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)	گرجی (Gorjee)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)
اسدآباد (Asadabad)	به (Quince)	جاده احمدی (Ahmadi road)	سیب، یونجه (Apple, Alfalfa)
امیرآباد (Amirabad)	به (Quince)	امیریه (Amirieh)	گلابی (Pear)
فرح آباد (Farahabad)	به (Quince)	ابرسج (Abarsej)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)
بدشت (Bedasht)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)	علی کاهی (Alikahi)	به (Quince)
سعد آباد (Sadabad)	گلابی، به (Pear, Quince)	گنده پلو (Gondepolo)	گلابی، به (Pear, Quince)
درخانی آباد (Darkhaniabad)	سیب، گلابی، به (Apple, Pear, Quince)	حسین آباد (Hoseinabad)	سیب، به (Apple, Quince)
شاهکوه (Shahkoh)	به (Quince)	سمنان (Semnan)	
نگار من (Negarman)	سیب، به (Apple, Quince)	فولاد محله (Foladmahale)	سیب، گلابی، به(Apple, Pear, Quince)
		شهمیرزاد (Shahmirzad)	سیب، گلابی، به(Apple, Pear, Quince)
		دربند (Darband)	سیب، گلابی، به(Apple, Pear, Quince)

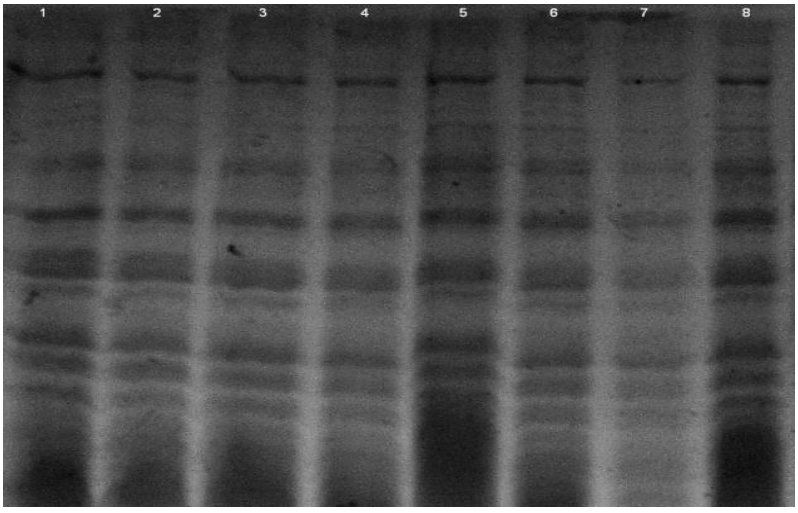
جدول۲: ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *E. amylovora* جداشده از درختان میوه دانه‌دار در استان سمنان براساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی

Table 2: Phenotypic characteristics of *E. amylovora* strains isolated from pome fruit trees in semnan Province on the basis of physiological, biochemical and morphological tests

نوع آزمون Test	واکنش Reaction	نوع آزمون Test	واکنش Reaction
واکنش گرم (پتاس۳٪) Gram reaction	−	استفاده از منابع کربنی Carbon Utilization	
تحرک Motility	+	سیترات Citrate	−
رشد هوازی/بی هوازی Oxidative/Fermentative	+	دکستین Dextin	−
تولید رنگدانه فلوروسنت Fluorescent Pigment	−	گلیسرول Glycerol	+
اکسیداز Oxidase	−	دولسیتول Dulcitol	−
تولید رنگ دانه صورتی روی محیط YDC (Pink Pigment onYDC)	−	اینولین Inolin	−
تولید رنگ دانه آبی روی محیط YDC (Blue pigment onYDC)	−	لاکتوز Lactose	−
تولید مواد احیاکننده از ساکارز Producing compounds from sucrose	+	مالتوز Maltose	−
لستیناز Lecithinase	−	دی مانیتول D-Manitol	+
تولید ایندول Indole production	−	دی مانوز D-Mannos	−
اوره‌آز Urease	−	ملی زیتوز Melezitoze	−
هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis	+	ملی بیوز Melibiose	−
هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis	−	دی سوربیتول D-Sorbitol	+
هیدرولیز اسکولین Sculin hydrolysis	+	دی گالاکتوز D-Galactose	+
هیدرولیز توئین ۸۰ Tween-80 hydrolysis	−	دی گلوکز D-Glucose	+
هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis	−	ریبوز Ribose	+
		ساکارز Sucrose	+
		تری هالوز Trehalose	+
		دی آرابینوز D-Arabinose	−
		فروکتوز Fructose	+

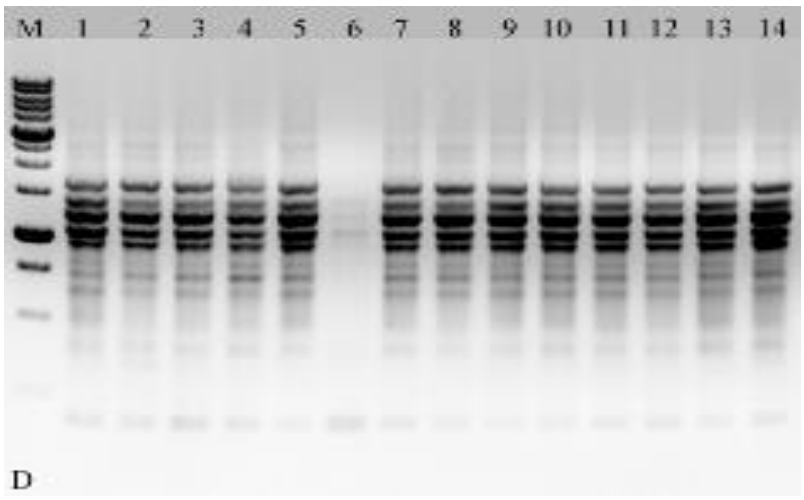
تعداد هشت استرین از مناطق مختلف استان با توجه به تنوع میزبانی در انگشت‌نگاری ژنتیکی به روش rep-PCR با دو آغازگر ERIC و BOX مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این روش تمامی استرین‌ها با هر دو آغازگر تکثیر شده و الگوی مشابهی در ژل آگارز ایجاد نمودند. این نتایج بیانگر هموژنی ژنتیکی بالا در گونه *E. amylovora* در استان سمنان می باشد (شکل ۲).

از نظر ژنتیکی استرین‌های استان به همراه استرین مرجع با روش rep-PCR مورد مقایسه انگشت‌نگاری DNA قرار گرفتند (شکل ۳). این روش ابزار بسیار قدرتمندی است که توانایی تفکیک باکتری‌ها را در سطح زیرگونه و استرین دارد. نتایج نشان داد که کمترین تفاوتی بین استرین‌ها و استرین مرجع 49946ATCC هم در ERIC-PCR و هم در BOX-PCR مشاهده نشد. rep-PCR یک روش بسیار معتبر، تکرارپذیر (Reproducible)، سریع و دارای قدرت تشخیص و تفکیک بالا است که می‌تواند جدایه‌ها را در سطح گونه، زیرگونه و بیووار شناسایی و تفکیک کند *لووز* و همکاران؛ *روبرتسون* و همکاران (Louws *et al*., 1994; Robertson *et al*., 2001). آغازگرهای به‌کار گرفته شده در این روش به‌منظور استفاده از توالی‌های تکرار شونده در طول ژنوم باکتری‌ها می‌باشد. این روش برای طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌ها تا سطح استرین کاربرد دارد *ورسالوویچ* و همکاران؛ *دبرویجن* و همکاران (Versalovic *et al*., 1994; De Bruijn, 1992). عامل بیماری از نظر ژنتیکی همسانی بسیار بالایی دارند. و روش‌هایی که تا اوایل سال ۲۰۰۷ از نظر DNA کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند مؤید این مسئله می‌باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ روی ۹۶ استرین از کشورهای مختلف و با دامنه میزبانی متفاوت انجام شد از مارکرهای جدیدی با توالی‌های مشخص استفاده شد که توانایی گروه‌بندی ژنتیکی این عامل را دارند ریکو و همکاران (Rico *et al*., 2008). در تحقیقی دیگرکه با تعداد کمی استرین که از سال‌های مختلف در ایران جمع‌آوری شده بود براساس روش RAPD-PCR مورد مقایسه قرار گرفتند تفاوتی در نتایج مشاهده نشده بود (Omidvar *et al*., 2006). تعیین تنوع ژنتیکی پاتوژن‌ها در همه‌گیرشناسی بیماری اهمیت دارد و پیش‌نیاز اساسی در توسعه روش‌های تشخیصی می‌باشد *باریونوی* و همکاران (Barionovi *et al*., 2006).



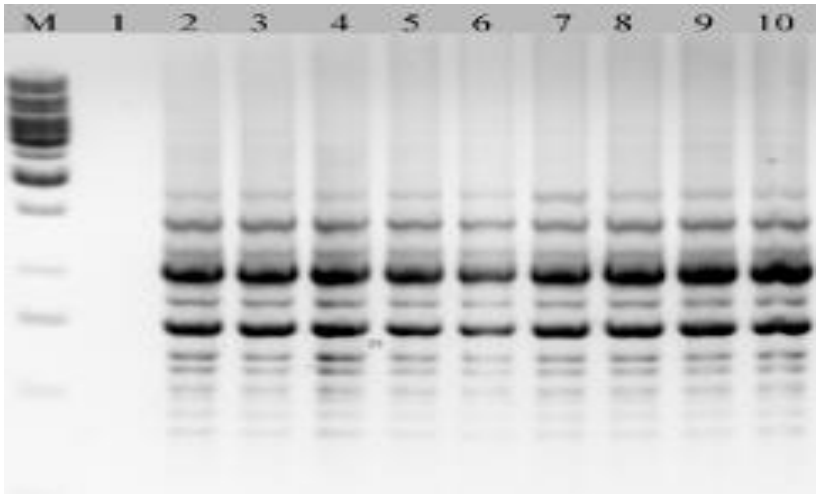
شکل ۱: پروفیل پروتئینی تعدادی از استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از درختان میوه دانه‌دار در استان سمنان در ژل پلی اکریل آمید (چاهک شماره ۱ استرین مرجع ATCC 49946، چاهک‌های ۲ و ۳ استرین‌های سایر مناطق کشور و چاهک‌های ۸-۴ استرین‌های استان سمنان)

Fig. 1: Protein prophiles of some strains of *E. amylivora* isolated from infected hosts of Semnan province in polyacryl amid gel (reference strain ATCC 49946 (lane1), strains of other regions (lanes 2-3) and strains of Semnan province (lanes 4-8)



شکل ۲: انگشت‌نگاری استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از استان سمنان (چاهک‌های ۱۴-۷)، استرین مرجع ATCC 49946 (چاهک ۱) و استرین‌های سایر مناطق (چاهک‌های ۶– ۲) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC

Fig. 2: Finger printing of *E. amylovora* strains of Semnan province (lanes 7-14), reference strain ATCC 49946 (lane1) and strains of other regions (lanes 2-6) in rep-PCR method using ERIC primers



شکل ۳: انگشت‌نگاری استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از استان سمنان (چاهک‌های ۱۰-۵)، استرین مرجع ATCC 49946 (چاهک ۲)، کنترل منفی (چاهک ۱) و استرین‌های سایر مناطق (چاهک‌های ۳ و ۴) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX

Fig. 3: Finger printing of *E. amylovora* strains of Semnan province (lanes 5-10), reference strain ATCC- 49946 (lane 2), negative control (lane1) and strains of other regions (lanes3- 4) in rep-PCR method using BOX primers

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که استرین‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان عامل این بیماری از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی همسان بوده و تا این زمان استرین مقاوم به مواد باکتری‌کش موجود به استان وارد نشده است و بنابراین در مدیریت این بیماری می‌توان از ترکیبات شیمیایی باکتری‌کش موجود کماکان با دغدغه کمتری استفاده نمود و در دیگر روش‌های مدیریتی نیز یکنواختی استرین‌ها کمک خواهد نمود که از یک رویه یکسان در تهیه ارقام مقاوم، پیش‌آگاهی بیماری و مدیریت تلفیقی آن استفاده گردد.

منابع:

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