استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR در بررسی تنوع ژنتیکی باکتری *Ralstonia solanacearum* مولد پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در استان کرمان

Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Infecting Potato in Kerman Province Using rep-PCR Analysis

حسین مرادی*

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۳۰

چکیده

باکتری *Ralstonia solanacearum* قادر است بالغ DNA بر ۳۰ خانواده مختلف گیاهی اعم از گیاهان زراعی و وحشی شامل سیب‌زمینی، توتون، گوجه‌فرنگی، بادنجان و بادام زمینی را آلوده نماید. یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی پژمردگی باکتریایی می‌باشد که در اثر باکتری *Ralstonia solanacearum* به‌وجود می‌آید. با استفاده از محیط‌کشت TTC از ساقه‌های پژمرده ارقام مختلف سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از مناطق عمده سیب‌زمینی‌کاری استان کرمان شامل جیرفت، ساردوئیه، لاله‌زار و صوغان تعدادی استرین از باکتری *Ralstonia solanacearum* جداسازی، سپس این استرین‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیای تعیین بیووار و بیماری‌زایی آنها بر روی گوجه‌فرنگی رقم Red Cloud ثابت شد. پس از آن با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و REP تنوع ژنتیکی استرین‌ها با روش واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی گردید. براساس درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با نرم‌افزار NTSYSpc2.0، استرین‌ها در دو گروه ژنتیکی قرار گرفتند که در بین استرین‌های هر گروه نیز تنوع مشاهده شد. به احتمال زیاد وجود تنوع ژنتیکی باکتری *R. solanacearum* در مناطق سیب‌زمینی‌کاری استان کرمان ناشی از ورود غده‌های بذری آلوده از سایر منابع آلوده به این استان است.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی، rep-PCR ، تنوع ژنتیکی، *Ralstonia solanacearum*

*: مربی، گروه آموزشی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سیستان و بلوچستان (Email: Hossmor@gmail.com)

مقدمه

بیماری پژمردگی باکتریائی با عامل *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith که قبلاً در جنس *Pseudomonas* قرار گرفته بود، یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریائی می‌باشد به‌طوری‌که باعث خسارت‌های اقتصادی زیادی در تمام جهان شده است. این باکتری به‌صورت یک بیماری اندمیک در اغلب مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در تمام دنیا می‌باشد *جانز* (Janse, 1996). این باکتری به‌طور غیرمعمول دارای دامنه‌ی وسیع میزبانی بوده که بر روی بیش از ۵۰ خانواده‌ی گیاهی مشاهده شده است *هیوارد* (Hayward, 2000). وجود تنوع زیاد در ضمینه‌ی ژنتیکی این باکتری مدیریت آن را دچار مشکل و نوسان می‌کند. اختلافات فنوتیپی و ژنوتیپی در گونه *R. solanacearam* ممکن است ناشی از تنوع زیاد میزبان‌های گیاهی این پاتوژن باشد. این میزبان‌ها در دامنه‌ی وسیع جغرافیایی و شرایط محیطی گوناگون قرار گرفته‌اند. براساس دامنه میزبانی، این گونه را به نژادهای مختلفی تقسیم‌بندی می‌کنند. اختلاف در فعالیت‌های متابولیسمی نیز باعث تقسیم‌بندی این گونه به بیووارهای مختلفی می‌شود. ارتباط مشخصی بین نژاد و بیووار وجود ندارد، اما نژاد ۳ در بیووار ۲ قرار می‌گیرد.

برای بررسی درون گونه‌ای این باکتری روش‌های مختلفی چون بررسی دامنه‌ی میزبانی، خصوصیات بیوشیمیایی هه و همکاران (He *et al.*, 1983)، آنالیز اسیدهای چرب *جانز* (Janse, 1991)، نیم‌رخ پروتئینی *دیانس* و *دریستیک* (Dianese and Dristig, 1994) و... وجود دارد. روش‌های مولکولی مانند مقایسه توالی 16S rRNA، نشانگر RFLP، نشانگر AFLP، و روش rep-PCR *واندر ولف* و همکاران (Van der Wolf *et al.*, 1998) نیز ارایه شده که می‌توان با صرف وقت و هزینه کم تنوع ژنتیکی باکتری را بررسی نمود. یک‌سری ترادف‌های تکراری در ژنوم تمام میکروارگانیسم‌ها وجود دارد، از این‌رو یکی از بهترین مشخصات این سلول‌ها ترادف‌های تکراری است. تعدادی از قطعات این ترادف‌های تکراری در ژنوم باکتری‌ها (نه همه‌ی آن‌ها) پیدا شده است. هرچند که عملکرد دقیق این ترادف‌های تکراری در ژنوم پروکاریوت‌ها مشخص نیست اما حضور این ترادف‌ها می‌تواند برای چندین کاربرد ژنتیکی به کار گرفته شود. سه خانواده از این تLرادف‌های تکراری شامل: ترادف REP (Repetitive extragenic palindromic یا PU (Palindromic unit) شامل ۳۵ تا ۴۰ جفت باز، ترادف ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) یا IRU (Intergenic repeat unit) شامل ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت باز، و ترادف BOX شامل ۱۵۴ جفت باز مطالعه شده است. براساس این ترادف‌ها روشی طراحی شده است که ژنوم مابین این دو ترادف را تکثیر می‌کند یعنی آغازگرهایی مطابق با این ترادف‌های تکراری سنتز می‌شود و سپس با استفاده از PCR این قسمت تکثیر شده و می‌توان تفاوت را بین جدایه‌های مختلف براساس این اطلاعات تعیین کرد. نام این روش ERIC-PCR، REP-PCR و BOX-PCR خوانده می‌شود که در مجموع به آن rep-PCR گفته می‌شود. انگشت‌نگاری به‌دست آمده توسط این روش دارای کاربردهای مختلف در مطالعات اپیدمیولوژیکی خصوصاً چگونگی کنترل این میکروارگانیسم‌ها در بخش پزشکی، کشاورزی و صنعت می‌باشد *لوپسکی* و *وینستوک* (Lupski and Weinstock, 1992). هدف از این مطالعه بررسی کاربرد روش rep-PCR در مشاهده میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق عمده‌ی سیب‌زمینی استان کرمان بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در طول سال‌های زراعی ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱، ضمن بازدید از مناطق عمده سیب‌زمینی‌کاری استان کرمان از ۴۲ منطقه شهرستان‌های جیرفت، ساردوئیه، لاله‌زار و صوغان نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌های مشکوک به بیماری پژمردگی باکتریایی با علایم پژمردگی، کوتولگی و قهوه‌ای شدگی حلقه آوندی همراه با ترشحات باکتریایی همراه با مشخصات جمع‌آوری گردیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. غده‌های آلوده ابتدا کاملاً با آب شستشو داده شدند تا گل‌ولای و آلودگی‌های سطحی آنها حذف شوند سپس با هیپوکلریت یک درصد ضدعفونی گردیده و برای جداسازی قطعاتی از غده در محل حلقه آوندی با تیغ اسکالپل استریل به آب مقطر استریل منتقل گردید سپس یک قطره از آب حاوی باکتری به‌صورت خطی بر روی محیط‌کشت افتراقی TTC (محیط‌کشت حاوی ۲، ۳، ۵-تری فنیل تترازولیوم کلراید)کشت گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ۲ یا ۳ روز ،تک پرگنه‌های گرد نامنظم، لعاب‌دار و با مرکز صورتی رنگ انتخاب شد و برای تکثیر مجدد این تک پرگنه‌ها به روی محیط‌کشت CPG (Casamino acid pepton glucose) منتقل گردیدند.

استخراج DNA

ابتدا باکتری در محیط CPG کشت گردید و در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۴۸

ساعت، این محیط به لوله‌ی ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و با سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور در مدت ۵ دقیقه باکتری رسوب داده شد. برای استخراج DNA از باکتری‌ها از روش *گومز* و همکاران (Gomes *et al.*, 2000) استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA با اسپکتروفتومتری سنجیده شد.

آزمون rep-PCR و الکتروفورز

برای انجام rep-PCR از روش *کومار* و همکاران (Kumar *et al.*, 2004) استفاده شد. در شرایط مناسب برای تهیه ۴۰ میکرولیتر از محصول rep-PCR مقدار ۲۷/۲ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر، ۱/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (30 pmol/µl)، ۴ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۸ میکرولیتر مخلوط dNTP(10mM)، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (1.5 mM)، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl) و ۴ میکرولیتر DNA نمونه (20 ng/µl) استفاده گردید. توالی آغازگرها در جدول ۱ آمده است. الکتروفورز محصول rep-PCR با شدت ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت در ژل آگارز ۱ درصد در بافر 1X TBE انجام شد. رویت باند با استفاده از اتیدیوم بروماید (1 µg/ml) و با استفاده از دستگاه Gel document صورت گرفت.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده درآزمون rep-PCR

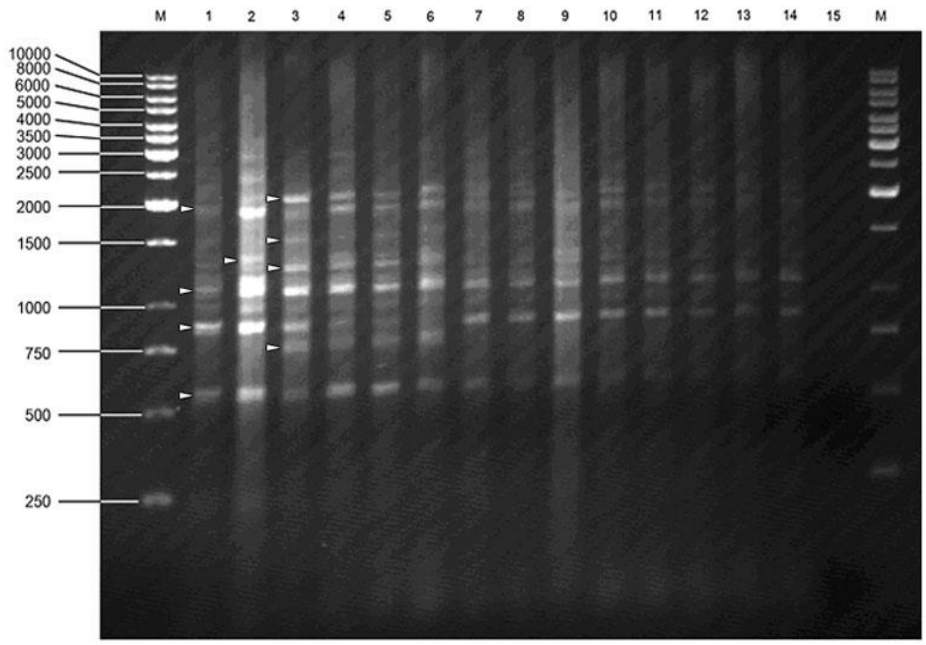
Table 1: Primers used in rep-PCR test

آغازگر Primer	ترادف آغازگر ′3→′5 Primer sequence ′3→′5
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG
REP1R-I	IIIICGICGICATCIGGC
REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC

نتایج وبحث

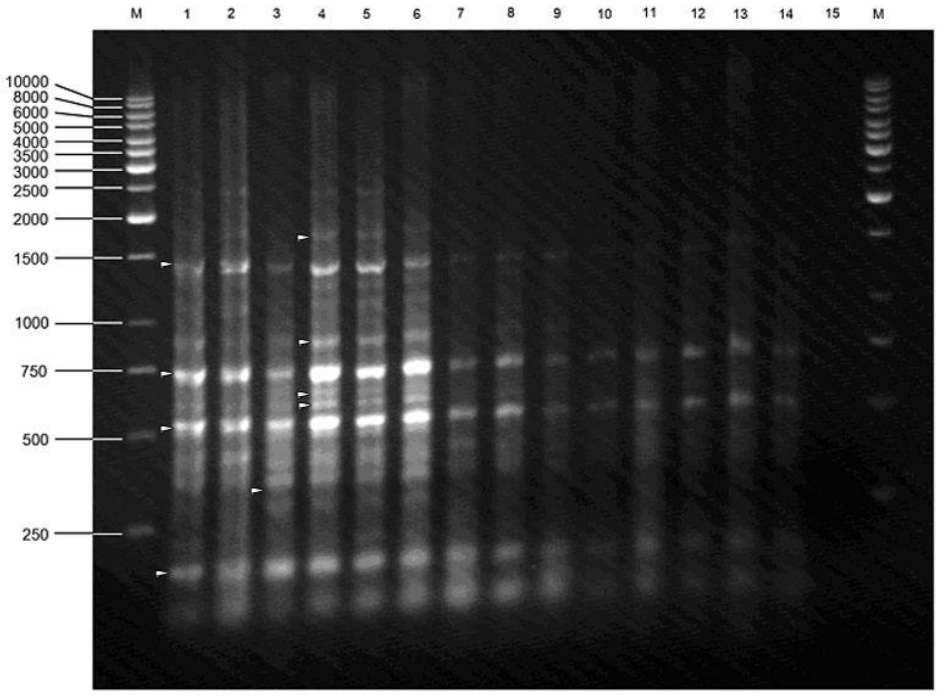
پس از جداسازی باکتری *Ralstonia solanacearum* از غده‌های آلوده باکتری‌ها روی محیط‌کشت TTC تلقیح شد که دو نوع پرگنه شکل گرفت، یکی از آن‌ها پرگنه‌های لعاب‌دار نامنظم و با مرکز صورتی وحاشیه‌ی سفید بود و دیگری پرگنه‌های خشک گرد کوچک با رنگ قرمز تیره بود. DNA تمام جدایه‌های به‌دست آمده به‌عنوان الگو در آزمون rep-PCR استفاده شد. نقوش حاصل از آغازگرهای BOX، ERIC و REP به‌ترتیب در شکل‌های ۱، ۲ و۳ نشان داده شده‌اند. وجود و یا عدم وجود نوارهای DNA در جدایه‌ها به‌صورت صفر و یک براساس ترکیب داده‌های حاصل از BOX، ERIC و REP در برنامه‌ی NTSYSpc2.0 با روش UPGMA تجزیه و تحلیل گردید و درخت فیلوژنی رسم شد (شکل ۴). کلاستر اول شامل جدایه‌های R 101، R 103، R 109، R 121، R 204 و R 207 جداسازی شده از مناطق جیرفت و ساردوئیه و کلاستر دوم شامل جدایه‌های R 209، R 215، R303، R 405، R 410، R 418، R 503 و R 600 از مناطق ساردوئیه، جیرفت و صوغان و بودند.

آزمون rep-PCR بر روی تمام جدایه‌ها انجام شد که از بین آنها تعداد ۱۴ جدایه با تنوعی که نشان دادند انتخاب گردیدند. پس از انجام آزمون rep-PCR نقوش آن با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و REP به‌دست آمد. برای افزایش اختصاصی بودن کار، مجموعه‌ی نقوش به‌دست آمده با همدیگر ترکیب شد و در برنامه‌ی NTSYSpc2.0 درخت فیلوژنی آن رسم گردید (*کومار* و همکاران، 2004). بر این اساس جدایه‌ها در دو کلاستر کلی قرار گرفتند در داخل دو کلاستر نیز گروه‌هایی ایجاد شد به‌طوری در کلاستر اول جدایه‌های R 121 و R 204 در یک گروه و در کلاستر دوم جدایه‌های R 215، R 303 و R 405، R 410 با هم در گروه‌های جداگانه و جدایه‌های R 209 به‌همراه R 503 و R 600 در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌ی R 600 و جدایه‌ی R 503 (هر دو از صوغان) نیز در یک ردیف قرار گرفتند.



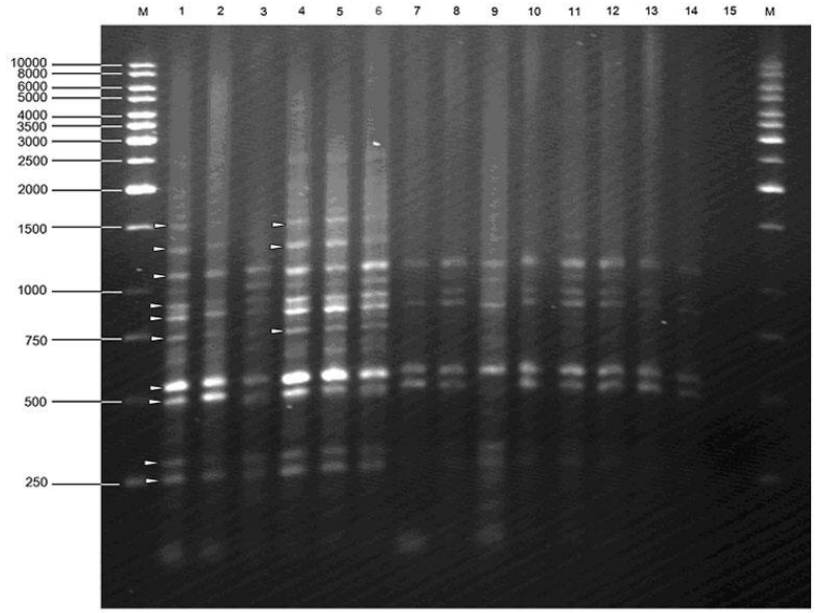
شکل ۱: الگوی DNA تکثیر شده در ۱۴ جدایه منتخب بیوار ۲ باکتری *Ralstonia solanacearum* با استفاده از آغازگر BOX، M: نردبان ژنومی یک کیلوبازی، ۱۵: شاهد منفی

Fig. 1: DNA fingerprinting of 14 selected isolates of biovar 2 *Ralstonia solanacearum* by using BOX primer, M: DNA ladder 1kb (Fermentase), 15: Negative control



شکل ۲: الگوی DNA تکثیر شده در ۱۴ جدایه منتخب بیوار ۲ باکتری *Ralstonia solanacearum* با استفاده از آغازگر ERIC، M: نردبان ژنومی یک کیلوبازی، ۱۵: شاهد منفی

Fig. 2: DNA fingerprinting of 14 selected isolates of biovar 2 *Ralstonia solanacearum* by using ERIC primer, M: DNA ladder 1kb (Fermentase), 15: Negative control

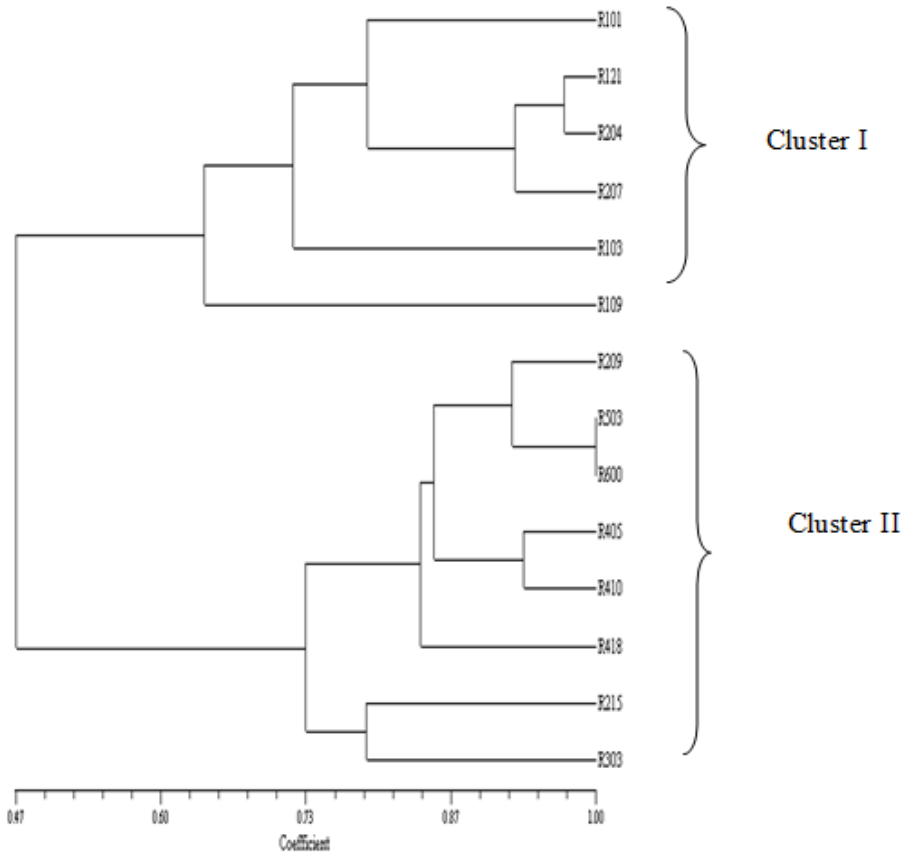


شکل ۳: الگوی DNA تکثیر شده در ۱۴ جدایه منتخب بیوار ۲ باکتری *Ralstonia solanacearum* با استفاده از آغازگر REP، M: نردبان ژنومی یک کیلوبازی، ۱۵: شاهد منفی

Fig. 3: DNA fingerprinting of 14 selected isolates of biovar 2 *Ralstonia solanacearum* by using REP primer, M: DNA ladder 1kb (Fermentase), 15: Negative control

در ارتباط با جدایه‌های صوغان هیچ‌گونه تنوعی مشاهده نشد و همگی الگوی یکسانی را ایجاد نمودند. به همین دلیل بقیه جدایه‌های صوغان حذف و تنها دو جدایه از آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌های به‌دست آمده از جیرفت و ساردوئیه دارای تنوع بودند به‌طوری‌که در هر دو کلاستر قرار گرفتند. ولی جدایه‌های مربوط به صوغان در کلاستر II طبقه‌بندی شدند.

در مطالعه‌ی مشابهی جدایه‌های باکتری از قسمت‌های مختلف قاره‌ی آسیا از روی سیب‌زمینی جداسازی گردید. بر این اساس آزمون rep-PCR بر روی جدایه‌هایی که متعلق به بیوار N_2 و نژاد ۳ باکتری بودند انجام گرفت و جدایه‌ها در دو گروه قرار گرفتند. گروه یک شامل جدایه‌های ژاپنی و گروه دوم شامل جدایه‌های هندی و فیلیپینی بود *هوریتا* و همکاران (Horita *et al.*, 2005)، مطالعه‌ای دیگر نیز در سال 2001 انجام گرفت که براساس آن بیوار N_2 جداشده از سیب‌زمینی در دو گروه قرار گرفت *هوریتا* و *تسوچیا* (Horita and Tsuchiya, 2001). *کوماز* و همکاران در سال 2004 گزارش کردند که بیوار ۳ حالت غالب در هند است، براساس این گزارش طبق آزمون rep-PCR، جدایه‌های باکتری در ۳ کلاستر قرار گرفت.



شکل ۴: نمودار خوشه‌ای ۱۴ جدایه منتخب بیوار ۲ باکتری *Ralstonia solanacearum* بر مبنای روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc2.0

Fig. 4: The dendrogram of 14 selected isolates of biovar 2 *Ralstonia solanacearum* on the base of UPGMA method, using NTSYSpc2.0 software

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.