بررسی بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار و اثر ضد باکتریایی برخی اسانس‌های گیاهی بر باکتری عامل آن در استان کرمان*

STUDY ON CANKER DISEASE OF STONE FRUITS AND ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SOME PLANT ESSENTIALS ON ITS CAUSAL AGENT IN KERMAN PROVINCE

پژمان خدایگان[1]**، ابراهیم صداقتی[1]، اکبر حسینی‌پور[2] و ساره بقایی راوری[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۳۰)

چکیده

علایم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در مناطقی از استان کرمان به‌صورت پراکنده مشاهده شد. از نمونه‌های مشکوک، باکتری سودوموناس روی محیط آگار غذایی حاوی ساکاروز جدا گردید. تعدادی از جدایه‌ها در توتون فوق‌حساسیت ایجاد کردند، کاتالاز مثبت بوده، در محیط ۵ درصد نمک طعام رشد کردند و توانائی تولید رنگدانه سبز فلورسنت، هیدرولیز ژلاتین، کازئین، آربوتین و توئین ۸۰ را داشتند. واکنش اکسیداز، اوره‌آز و آرژنین دهیدرولاز منفی و هیدرولیز نشاسته، لستیناز، احیا نیترات، توانائی در لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و رشد در ۳۷°C در آنها دیده نشد. این جدایه‌ها ازگالاکتوز، مانوز، مانیتول، سوربیتول و آرابینوز اسید تولید کرده، ولی هیچکدام از لاکتوز، مالتوز و دی- تارتارات استفاده نکردند. جدایه‌های اکسیداز منفی با تولید زهرابه از رشد قارچ *Geotrichum candidum* ممانعت نمودند و قطعه ۷۲۰ جفت بازی از ژن *syrB* در آنها تکثیر شد. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی این جدایه‌ها شبیه به پاتووار مرجع *Pseudomonas syringae pv. syringae* (IBSBF451) بود و بیماری‌زایی آنها با تزریق سوسپانسیونی حاوی 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر به سرشاخه‌های هلو، به اثبات رسید. براساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی و تعیین توالی ناحیه ITS، باکتری‌های مذکور *Pseudomonas syringae pv. syringae* تشخیص داده شدند. برای بررسی اثر ضدباکتریایی، اسانس تعدادی از گیاهان استخراج و در شرایط آزمایشگاهی بر جدایه‌ها آزموده و نتایج آن با اثر ۱۳ ترکیب آنتی‌بیوتیکی مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد که از میان آنتی‌بیوتیک‌ها، تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین از رشد کلیه جدایه‌ها ممانعت به عمل آوردند، اما در برابر آمپی‌سیلین، سفالکسین و اگزاسیلین، حساسیت مشاهده شد. آزمون مذکور نشان داد که برخی از اسانس‌ها دارای خاصیت ضد باکتریائی هستند و در میان آنها اسانس آنغوزه و رزماری، دارای بیشترین تأثیر بوده و با اثرات اکسی‌تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین برابری می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس سیرینگی، شانکر باکتریایی هسته‌داران، شناسایی، اسانس گیاهی، کرمان

---

*: این تحقیق براساس طرح پژوهشی شماره AGR 83 pp 101، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان انجام شده است.

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pkhodaygan@vru.ac.ir

۱. استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه

درختان میوه هسته‌دار که اغلب بومی مناطق معتدله هستند متعلق به خانواده گلسرخیان، زیرخانواده بادامیان و جنس آلو می‌باشند. این جنس بزرگ شامل هلو، شلیل، آلو، گوجه، گیلاس، زردآلو، بادام و گونه‌های زیادی است که فقط به‌عنوان پایه یا به‌صورت زینتی کشت می‌شوند (Rasoolzadegan 1997). شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار که یکی از بیماری‌های مهم این درختان است، در اغلب مناطق عمدهٔ کشت درختان میوه هسته‌دار شیوع دارد. این بیماری تحت نام‌های گوناگونی همچون گموز، سرخشکیدگی و بلایت جوانه نامیده می‌شود (Agrios 2005). بارزترین علایم این بیماری، تشکیل شانکر همراه با تراوشات صمغی بر روی شاخه و تنه درختان میوه هسته‌دار است. نواحی آلوده فرورفته و به رنگ تیره‌تری نسبت به پوست سالم هستند. شاخه‌های آلوده معمولاً به سمت پایین خشک می‌گردند. در صورتی‌که شانکر توسعه یافته و دور تا دور تنه یا شاخه‌های جانبی را فرا گیرد، بخش‌های بالایی قسمت مبتلا طی چند هفته می‌میرند (Ogawa *et al.* 1995; Agrios 2005). این بیماری برای اولین‌بار از لهستان گزارش شد سپس بیماری مشابهی در امریکا از گیلاس گزارش شده و عامل آن *P. cerasus* نامیده شد. در مطالعات بعدی همه گونه‌هایی را که قبلاً به عنوان عامل ایجادکننده شانکر باکتریایی درختان هسته‌دار شناخته شده بود در *P. syringae* طبقه‌بندی شده و فقط گونه *P. morspronorum* از آنها مجزا شد (Banappor *et al.* 1991). در ایران این باکتری از انواع مختلف درختان میوه هسته‌دار در استان‌های تهران، فارس، اصفهان، مازندران جداسازی و گزارش داده شده است (Banappor *et al.*, 1991; Elahinia and Rahimian.1994; Aleyasin and Banihashemi, 1994). اولین‌بار *بهار و همکاران* این بیماری را روی درختان زردآلو در اصفهان مشاهده نمود (Baharr *et al.* 1985). *بناپور و همکاران* عامل شانکر و سرخشکیدگی درختان گیلاس را در منطقه دماوند (*Pss*) *P. s.* pv. *syringae* تشخیص دادند (Banappor *et al.* 1991). به دنبال آن در سال ۱۳۷۲ آل‌یاسین ۷۳ جدایه *Pss* را در نقاط مختلف استان فارس روی درختان بادام، زردآلو و هلو جداسازی و تشخیص داد (Aleyasin and Banihashemi 1994). *شمس‌بخش و رحیمیان* این باکتری را به‌عنوان عامل شانکر درختان زردآلو در مازندران معرفی نمودند (Shams-bakhsh and Rahimian 1998). *الداغی و همکاران* استرین‌های جدا شده از درختان میوه هسته‌دار، گندم و جو از استان‌های مختلف را از نظر خصوصیات فنوتیپی، سرولوژیکی و مولکولی مورد مقایسه قرار داد (Aldaghi *et al.* 2010). گونه‌های دیگر این جنس نیز باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در بسیاری از محصولات زراعی، باغی و زینتی شده و علایمی مانند شانکر، لکه برگی، بلایت، پوسیدگی نرم و گال به‌وسیله آنها ایجاد می‌گردد. به نظر می‌رسد مهم‌ترین گونه این جنس *P. syringae* بوده که بیش از ۵۰ پاتووار توصیف شده دارد (Gnanamanickam 2007). دامنه میزبانی این گونه بسیار وسیع بوده و بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی متعلق به جنس‌ها و خانواده‌های مختلف به‌عنوان میزبان آن شناخته می‌شوند (Young *et al.* 1996).

واژه پاتووار برای تفکیک و تشخیص باکتری‌ها در داخل یک گونه و برمبنی قابلیت متفاوت آنها در بیماری‌زایی بر میزبان‌های مختلف، ارائه شده است (Dye *et al.* 1980). تقسیم‌بندی پاتووارها براساس بیماری‌زایی آنها در گیاهان مختلف بوده و جهت تشخیص،

از ویژگی‌های کلیدی و آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای بهره گرفته شده است. با توجه به مبهم بودن مفهوم پاتووار و عدم وجود همبستگی کامل میان بیماری‌زایی و ویژگی‌های فنوتیپی، تشخیص پاتووارها به آسانی مقدور نبوده و تاکسونومی پاتووارهای *P. syringae* نیازمند بازنگری است (Gnanamanickam 2007; Weingart and Volksch 1997). به‌علاوه پاتووار بخشی از تاکسونومی سلسله‌ای نیست، بنابراین ممکن است با کامل شدن اطلاعات در مورد سطوح گونه و زیر گونه، حذف گردد (Braun-Kiewnick *et al.* 2000). در سایر مناطق دنیا علاوه بر پاتووار syringae، پاتووارهای *P. s.* pv. *avii* و *P. s.* pv. *morsprunorum* نیز به عنوان عوامل این بیماری گزارش شده‌اند (Menard *et al.* 2003)، گرچه تاکنون گزارشی در این زمینه از ایران وجود ندارد. بررسی اخیر به منظور شناسائی عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار در استان کرمان صورت گرفت. ضمنا به منظور بررسی مقدماتی، تأثر بازدارندگی تعدادی از اسانس‌های گیاهان دارویی بومی استان کرمان، روی عامل بیماری سنجیده شد. چکیده نتایج این بررسی قبلاً ارائه شده است (Khodaygan *et al.* 2008).

روش بررسی

جداسازی و کشت

برگ‌ها و سرشاخه‌های درختان میوه هسته‌دار شامل آلو (*Prunus domestica*)، زردآلو (*Prunus armenica*) و هلو (*Prunus persica*) که دارای علایم شانکر، زخم‌های نکروزه با حاشیه آبسوخته و لکه‌برگی غربالی بودند، از منطق مختلف استان کرمان جمع‌آوری گردید. مشخصات جدایه‌ها شامل زمان، منطقه و گیاه میزبان، در جدول ۱ درج گردیده است. پس از شستشو با آب، بخش‌های آلوده جدا گردید و به قطعات کوچک تقسیم شد. این قطعات در چند قطره آب مقطر در داخل تشتک‌های استریل خرد گردیدند. نیم ساعت پس از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق، قطره‌ای از سوسپانسیون حاصل روی محیط آگار غذائی حاوی ۰/۵٪ سوکروز (۲۳ گرم نوترینت آگار، ۵ گرم سوکروز دریک لیتر آب) مخطط گردید. تشتک‌های کشت شده در دمای ۲۵ ^{o}C نگهداری شدند. دو تا سه روز پس از کشت، پرگنه‌های باکتری به رنگ سفید تا بژ، به قطر ۳-۲ میلی‌متر در سطح محیط ظاهر گردیدند. پرگنه‌های مجزا برای خالص‌سازی روی محیط کینگز- ب مخطط گردید (Schaad *et al.* 2001).

آزمون‌های فنوتیپی

آزمون‌های بیوشیمیائی و فیزیولوژیک طبق روش‌های متداول (Fahy & Hayward 1983، Lelliott & Stead 1987، Schaad *et al.*, 2001) انجام شد. طیف منابع کربن قابل مصرف جدایه‌ها، با استفاده از محیط معدنی پایه *آیر* (Ayer) و *همکاران* (برگرفته از Schaad *et al.* 2001) بررسی شد. قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه با روش تندال استریل و به غلظت نهائی ۰/۲ تا یک درصد به محیط پایه اضافه شد. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منابع کربنی براساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسیدیته محیط کشت نسبت به شاهد (محیط آیر فاقد منبع کربنی) تا سه هفته پس از کشت و نگهداری تشتک ها در دمای ۲۸-۲۵ $^{\circ}$C، ارزیابی گردید.

آزمون بیماری‌زایی

جدایه‌های اکسیداز منفی و دارای قابلیت القا واکنش فوق‌حساسیت در توتون (۵۰ جدایه)، روی محیط آگار غذایی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸ $^{\circ}$C کشت و

جدول ۱. فهرست جدایه‌های باکتریایی به‌دست آمده در پژوهش

Table 1. The list of bacterial isolates

محل نمونه‌برداری Sampling location	گیاه میزبان Host Plant	شماره جدایه‌ها Isolates number	زمان نمونه‌برداری Date of sampling
بافت Baft	آلو (*Prunus domestica*)	63-69	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	70-82	
	هلو (*Prunus persica*)	83-90	
بردسیر Bardsir	آلو (*Prunus domestica*)	46-49	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	50-56	
	هلو (*Prunus persica*)	57-62	
رفسنجان Rafsanjan	آلو (*Prunus domestica*)	1-5	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	6-19	
	هلو (*Prunus persica*)	20-25	
زرند Zarand	آلو (*Prunus domestica*)	21-23	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	24-30	
	هلو (*Prunus persica*)	31-32	
سرچشمه Sarcheshmeh	آلو (*Prunus domestica*)	33-36	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	37-42	
	هلو (*Prunus persica*)	43-45	
شهربابک Shahrebabak	آلو (*Prunus domestica*)	91-95	بهار و تابستان ۱۳۸۴، ۱۳۸۵ Spring and Summer of 2005-6
	زردآلو (*Prunus armenica*)	96-107	
	هلو (*Prunus persica*)	108-116	
کرمان Kerman	آلو (*Prunus domestica*)	117-121	بهار و تابستان ۱۳۸۴ Spring and Summer of 2005
	زردآلو (*Prunus armenica*)	122-129	
	هلو (*Prunus persica*)	13-132	

سوسپانسیونی با غلظت 10^6 cfu/ml (براساس میزان کدری سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر و رقیق‌سازی و کشت رقت حاصله روی محیط کشت و شمارش پرگنه) تهیه شد. سوسپانسیون با کمک سرنگ به سرشاخه نهال هلو (*Prunus persica*) در شرایط طبیعی یک باغ، در چند نقطه تزریق شد. به‌عنوان شاهد از آب مقطر استریل برای تزریق استفاده شد (Arabi *et al*. 2006).

بررسی تولید زهرابه سرینگومایسین یا ایزومرهای آن در محیط کشت

آزمون بررسی تولید سیرینگومایسین با استفاده از قارچ *Geotrichum candidum* انجام شد. ممانعت از رشد

قارچ *Endomyces geotrichum* (Anamorph :*G. candidum*) در اثر تولید زهرابه توسط باکتری روی محیط PDA مورد ارزیابی قرار گرفت. چهار جدایه باکتری در چهار سمت تشتک‌ها کشت گردید. پس از پنج روز سوسپانسیونی از سلول‌های قارچ تهیه شده و بر روی سطح محیط کشت پاشیده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸°C–۲۵ نگهداری گردید (Bultreys and Gheysen 1999).

مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی

برای استخراج پروتئین‌های سلولی، جدایه‌های بیماری‌زا به همراه جدایه مرجع (*Pss*, IBSBF(Biological Institute Culture Collection Of Phytopathogenic Bacteria, Brazil)451(روی محیط آگار غذایی کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، سوسپانسیونی از آنها در آب مقطر تهیه و جذب نوری آنها در طول موج ٦٠٠ نانومتر برابر با یک تنظیم شد. سلول‌ها با اضافه کردن یک دهم حجم نمونه، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰درصد و پنج دقیقه نگهداری در حمام آب جوش پاره شده و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین حاصل به‌عنوان پروتئین‌های سلولی در الکتروفورز به‌کار برده شدند. الکتروفورز در حضور SDS در سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) با ژل متراکم‌کننده پنج درصد حاوی نیم مولار تریس و نیم درصد SDS با اسیدیته ۶/۸ و متمایزکننده ۱۰ درصد حاوی ۱/۵ مولار تریس به‌علاوه یک درصد SDS با اسیدیته ۸/۸ و در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی‌آمپر انجام شد. به هر نمونه معادل ۲۰ درصد گلیسیرین و ۰/۰۱ درصد رنگ برم فنل بلو اضافه شد و ۴۵ میکرولیتر از آن در هر چاهک ژل بارگذاری گردید. الکتروفورز با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل پایان پذیرفت. ژل در محلول رنگ‌آمیزی حاوی ۰/۱۲ درصد کوماسی بریلیانت‌بلو، ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسیداستیک به مدت یک شب بر روی چرخاننده قرار داده شد. ژل در محلول ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسیداستیک تا زمان آشکار شدن نوارهای پروتئینی، رنگ‌بری و برای کاهش رنگ زمینه، به اسیداستیک هفت درصد منتقل گردید و از آن عکس گرفته شد (Ahmadvand and Rahimian 2005).

استخراج DNA

جدایه‌ها در محیط آگار غذایی کشت شد. پس از دو روز رشد در دمای ۲۸°C–۲۵، سلول‌ها در آب مقطر سوسپانسیون شدند. کدری سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲–۰/۱ واحد تنظیم گردید. به نمونه ۰/۱ حجم هیدروکسیدپتاسیم یک نرمال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه جوشانده شدند و اسیدهای نوکلئیک با استفاده از روش معمول فنل و کلروفرم، استخراج گردید (Ausubel *et al*. 1992). برای تعیین خلوص و غلظت، دو میکرولیتر از اسیدنوکلئیک استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. بررسی غلظت DNA کل استخراج شده با مقایسه شدت نوار حاصله در مقایسه با مقدار مشخصی از DNA فاژ لامبدا صورت گرفت (Ausubel *et al*. 1992).

ردیابی جدایه‌ها بوسیله PCR

واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهای B2- TCGATTTTGCCGTAATGAGTC و l- CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG (شرکت MWG آلمان) متشکل از بافر ۱X(۵۰ میلی‌مولار کلریدپتاسیم و ۱۰ میلی‌مولار تریس با اسیدیته ۸/۳)، نیم میلی‌مولار از هر آغازگر، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱/۵ میلی‌مولار

کلریدمنیزیم، دو واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز (شرکت سیناژن ایران) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۴ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۱/۵ دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای ۶۰°C به مدت ۱/۵ دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲°C به مدت سه دقیقه بود. تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد (Sorensen *et al.* 1998).

تکثیر ناحیه بین ژنی اسیدهای نوکلئیک ریبوزومی rRNA (Intergenic Transcribed Spacer, (ITS 16s–23s و تعیین توالی

واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهای D21-AGCCGTAGGGGAACCTGCGG و D22-TGACTGCCAAGGCATCCACC (شرکت MWG آلمان) انجام شد. شرایط زمانی و دمائی شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۶ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. یک چرخه تکثیر نهائی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد (Manceau and Horvais 1997). قطعات تکثیر شده پس از بارگذاری در ژل آگاروزی یک درصد و الکتروفورز با استفاده از کیت Nucleospin Extract II ساخت شرکت Macherey-Nagel آلمان و براساس روش توصیه شده، از ژل جدا و خالص‌سازی گردید و سپس برای تعیین توالی ارسال شد. تعیین توالی در شرکت MWG آلمان و با روش Di-deoxy با دستگاه‌های ABI و در هر دو جهت سنس و آنتی سنس و با استفاده از آغازگرهای D21 و D22، انجام گرفت.

آنالیز رایانه‌ای توالی‌ها

توالی‌های به‌دست آمده، ابتدا با استفاده از برنامه Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) اصلاح شده و سپس با استفاده از برنامه BLAST(NCBI) با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن همردیف گردید (Altschul 1990). آنالیز Multiple Sequence Alignment با استفاده از برنامه ClustalW انجام شد (Thompson 1994). فاصله ژنتیکی توالی جدایه‌ها و ارتباط فیلوژنتیکی آنها با یکدیگر و هم‌چنین با تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از برنامه MegAlign Ver. 5.00 در مجموعه (DNASTAR Inc., DNASTAR package) Madison, Wis. و هم‌چنین برنامه MEGA4. بررسی گردید.

استخراج اسانس از گیاهان و بررسی اثر آنها بر باکتری‌های بیماری‌زا

جهت استخراج، گیاهان رازیانه (*Foeniculum vulgaris*)، اکالیپتوس (*Eucalyptus camadulensis*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، نعناع (*Mentha sativa*)، درمنه (*Teucrium chamaedrys*)، آنغوزه (*Ferula assa-foetida*)، اسطوخدوس (*Lavandula stoechas*)، ریحان (*Ocimum basilicum*)، آلاله (*Ranunculus sceleratus*)، گشنیز (*Coriandrum sativum*)، بومادران (*Achillea millefolium*)، کاکوتی (*Ziziphora persica*) و زوفا (*Hyssopus officinalis*)، انتخاب شدند. بخش‌های انتخاب شده در سایه خشک شد و سپس با استفاده از دستگاه تقطیر گردشی (کلونجر) اسانس‌گیری گردید. اسانس به‌دست آمده در شیشه‌های

تیره و در دمای ۴°C نگهداری گردید. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های بیماری‌زا بر روی محیط کشت نوترینت آگار پخش گردید و مدتی پس از خشک شدن سطح محیط کشت به‌وسیله چوب پنبه سوراخ‌کن، چندین سوراخ با فواصل مساوی در آن ایجاد گردید. در هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از یک اسانس ریخته شد. به‌عنوان شاهد از آب مقطر استفاده گردید و پس از مسدود کردن دور تشتک‌های پتری با نوار پارافیلم تشتک‌ها در دمای ۲۸°C-۲۵ برای ۴۸ ساعت نگهداری گردید. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. نتایج این آزمون براساس مشاهده هاله بازدارنده از رشد، ارزیابی گردید. برای مقایسه اثر اسانس‌های گیاهی با برخی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از کیت آنتی‌بیوگرام شرکت پادتن طب مطابق با روش توصیه شده شرکت سازنده، استفاده شد.

نتایج

جداسازی

از کشت نمونه‌های آلوده (شکل ۱)، جدایه‌هایی با پرگنه‌های سفید رنگ تا بژ روی محیط NAS به‌دست آمد. قطر پرگنه‌ها بعد از دو روز در دمای ۲۵ °C حدود دو میلی‌متر و بعد از سه روز حدود سه میلی‌متر و با حاشیه صاف بود. یکصد و سی و دو جدایه با پرگنه‌های هم شکل که در محیط کینگز- ب رنگدانه فلورسانت تولید کردند، انتخاب شد. جدایه مرجع *Pss* از کلکسیون کشت برزیل (IBSBF 451) تهیه شد. کلیه جدایه‌ها، گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک، هوازی و کاتالاز مثبت بودند. جدایه‌های اکسیداز مثبت، فاقد توان تولید لوان و القا واکنش فوق‌حساسیت در برگ‌های توتون در این مرحله حذف شدند. پنجاه جدایه اکسیداز منفی برای شناسایی بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. هیچکدام از این جدایه‌ها قادر به تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و استفاده از ال- تارتارات نبودند. این جدایه‌ها لوان تولید کرده و همگی آربوتین و ژلاتین را هیدرولیز نمودند و در برگ‌های توتون واکنش فوق‌حساسیت ایجاد کردند. با استفاده از نتایج آزمون‌های فنوتیپی، این گروه از باکتری‌ها متعلق به گونه *P. syringae* (Palleroni *et al*. 1973; Schaad *et al.*2001) تشخیص داده شد. براساس طیف منابع کربنی مورد استفاده، باکتری جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار مشابه با *P. s.* pv. *syringae* (Young and Triggs 1994; Schaad *et al.* 2001; Bradbury 1986) تشخیص داده شد. ویژگی‌های فنوتیپی پنجاه جدایه اکسیداز منفی در جدول ۲ درج شده است.

بیماری‌زایی

جدایه‌های بیماری‌زا دو هفته پس از تزریق، در سرشاخه‌های هلو، شانکر ایجاد نمودند. شانکرها به آرامی گسترش یافته و حاشیه آن آبسوخته بود، در برخی موارد ترشحات صمغ نیز دیده شد. در همه موارد علایم ایجاد شده پس از مایه‌زنی مصنوعی، مشابه با علایم اولیه بود. در مشاهده میکروسکوپی نیز تراوش جمعیت سلول‌های باکتریایی (ooze)، از حاشیه بافت‌های آلوده، دیده شد. باکتری‌ها، مجدداً از گیاهان مایه‌زنی شده و آلوده، روی محیط کینگز- ب، جداسازی گردید. در گیاه شاهد که تنها با آب مایه‌زنی شده بودند، علایمی ظاهر نگردید. تعدادی از جدایه‌های اکسیداز مثبت که مورد سنجش بیماری‌زایی قرار گرفته بوده و فاقد توانایی القای واکنش فوق‌حساسیت در توتون بودند، هیچ‌گونه علائمی در گیاه ایجاد نکردند.

شکل ۱. علایم بیماری شانکر هسته‌داران در سر شاخه‌های هلو

Fig.1. Symptoms of bacterial canker on peach twigs

نقوش الکتروفورزی پروتئین سلولی

نقوش پروتئین‌های محلول سلولی برای پنجاه جدایه بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشخص نمود که این جدایه‌ها، الگوی یکسانی داشته و علاوه بر آن الگوی حاصل از آنها مشابه با الگوی پروتئین‌های محلول سلولی جدایه مرجع (IBSBF451) *Pss* بود. تصویر منتخب از سه جدایه به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف نمایش یافته است (شکل ۲).

بررسی تولید زهرابه در محیط مصنوعی و ردیابی جدایه‌ها به‌وسیله PCR

جدایه‌های بیماری‌زا و جدایه مرجع (IBSEF451) *Pss* با تولید زهرابه سرینگومایسین یا برخی از ایزومرهای آن، از رشد قارچ *Geotrichum candidum* جلوگیری کردند. ژن مولد زهرابه نیز در آزمون دیگری ردیابی گردید. بر این اساس در تمامی جدایه‌های بیماری‌زا، قطعه ۷۲۰ جفت بازی از ژن *syrB* تکثیر شد (شکل ۳). تعدادی از جدایه‌های غیر بیماری‌زا نیز در آزمون مورد سنجش قرار گرفتند. این جدایه‌ها از رشد قارچ جلوگیری نکرده و قطعه مذکور نیز در هیچ‌کدام تکثیر نشد.

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها براساس توالی ناحیه ITS

در تمامی جدایه‌ها قطعه ۶۰۰ جفت بازی از ناحیه ITS تکثیر شد (شکل ۴). تعیین توالی ناحیه ITS نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا قرابت فیلوژنتیکی به *P. s.* pv. *syringae* دارند و در یک خوشه مشترک در کنار آن قرار می‌گیرند.

نتایج حاصل از میزان بازدارندگی رشد توسط اسانس‌های گیاهی

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که اسانس‌های گیاهان مورد بررسی تأثیر نسبتاً خوبی در جلوگیری از رشد جدایه‌های باکتریایی داشتند. هم‌چنین جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و داکسی‌تتراسایکلین، حساسیت شدید و نسبت به استرپتومایسین، و اریترومایسین حساس و در برابر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و آگزاسیلین مقاوم بودند. نتایج حاصل از بررسی اثر اسانس‌های گیاهی نیز نشان داد که جدایه‌ها حساسیت بالایی به اسانس گیاهان آنغوزه، رزماری و کاکوتی نشان دادند (شکل ۶) و براساس قطر هاله بازدارنده، این آثار با تأثیر ترکیبات آنتی‌بیوتیکی

جدول ۲. ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای باکتری‌های جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در استان کرمان در مقایسه با یک جدایه مرجع *Pss* (IBSBF451)

Table 2. Morphological, biochemical and physiological characteristics of the bacterial strains isolated from stone fruits in Kerman province compared with those of standard *Pss* isolate (IBSBF451).

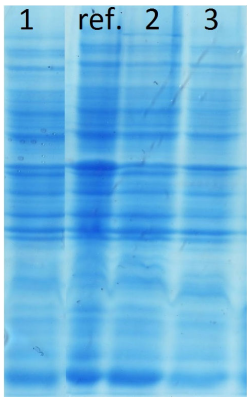
واکنش جدایه مرجع Reaction of a reference strain of *Pss* (ISBEF451)	واکنش جدایه‌های به‌دست آمده از هسته‌داران استان کرمان Reaction of strains isolated from stone fruits in Kerman	Characteristic	ویژگی
		Hydrolysis of :	هیدرولیز:
+	80[a]	Esculin	اسکولین
+	+	Casein	کازئین
+	55	Tyrosin	تایروزین
+	79	Tween-80	توئین ۸۰
+	+	Gelatin	ژلاتین
+	+	Arabutin	آربوتین
-	-	Starch	نشاسته
-	-	Arginine dihydrolase	هیدرولیز آرژنین
-	-	Lecithinase	لستیناز
-	-	Oxidase	اکسیداز
+	+	Catalase	کاتالاز
+	+	Growth on 5% NaCl	رشد در محیط حاوی ۵٪ نمک طعام
-	–	Growth on 7% NaCl	رشد در محیط حاوی ۷٪ نمک طعام
-	-	Nitrae reduction	احیای نیترات
-	-	Urease	اورآز
-	-	Production of indole	تولید اندول
-	-	MR	متیل رد
-	-	VP	استوئین
-	-	Potato rot	لهانیدن سیب‌زمینی
+	+	Reducing substances from sucrose	تواید مواد احیاکننده از سوکروز
+	+	Levan formation	تولید لوان
+	+	H2S production from cictein	تولید H2S از سیستئین
+	+	Tobacco hypersensitivity	فوق حساسیت در توتون
+	+	Production of syringomycin	تولید سرینگومایسین
+	+	Phosphatase activity	فسفاتاز
		Acid production from	تولید اسید از:
+	+	Galactose, Sucrose	گالاکتوز، سوکروز

ادامه جدول ۲

اتانول	Ethanol	–	–
د- آرابیتول	D-Arabitol	+	+
ال- آلانین	L-Alanin	+	+
د- مانیتول	D-Mannitol	+	+
گلیسرول، گلوکز	Glycerol, Glucose	+	
د- سوربیتول	D-Sorbitol	+	+
آرابینوز	Arabinose	+	+
مایواینوزیتول	mayo-Inositol	19	+
ملی‌بیوز	Melibiose	70	+

استرین مرجع (IBSBF451) *Pss*، – = همه جدایه‌ها پاسخ منفی داده‌اند. + = همه جدایه‌ها پاسخ مثبت داده‌اند. [a]= (درصد جدایه‌هایی که واکنش مثبت داشته‌اند).

Reference strain *Pss*(IBSBF451), - = negative results with all strains. + = positive results with all strains. [a] = percentage of strains with positive reaction.



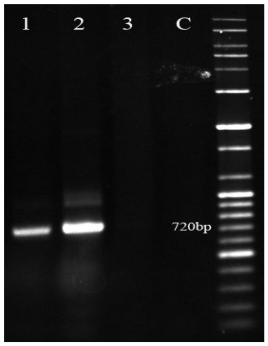
شکل ۲. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول سلولی نماینده جدایه‌های بیماری‌زا. ستون۱ (زردآلو)، ستون ۲ (هلـو)، سـتون۳ (آلـو) و ستون ref.، جدایه مرجع، *Pss* (IBSBF451)

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoretic protein profiles of pathogenic isolates inciting stone fruit canker. Lane 1 (apricot), lane 2 (peach), lane 3 (plum) and, lane ref. *Pss* (IBSBF451)

تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین برابری می‌نمود.

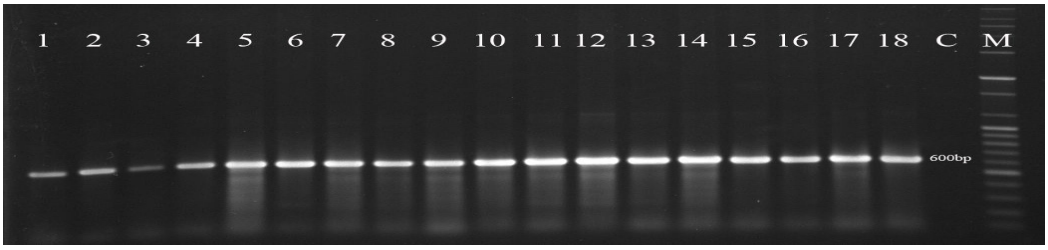
بحث

علایـم بیمـاری شـانکر باکتریـایی ناشـی از تعـدادی از پاتووارهـای *P. syringae* در بـسیاری از منـاطق کـشت درختان میوه هسته‌دار در استان کرمان مشاهده شد. با توجه به عدم امکـان شناسـایی دقیـق پاتووارهـای *P. syringae* براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولـوژیکی و مـشابه بودن دست کم چند پاتووار از نظـر ویژگـی‌هـای فنـوتیپی (Young and Triggs 1994; Gardan *et al.* 1999)، شناسایی و طبقه‌بندی پاتووارهای این‌گونه همـواره مـشکل بوده است. با توجه به نتایج آزمون‌های فنـوتیپی تـشخیص این گروه از جدایه‌های منتسب به پاتووار syringae میسر می‌باشد. یافته‌های این تحقیق با مطالعه انجام شده به‌وسیله



شکل ۳. قطعه ۷۲۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن *syrB*. ستون یک جدایه شماره ۲۰، ستون دو جدایه (IBSBF451) *Pss*، ستون سه *P. s.* pv. *maculicola* می‌باشد. M نشانگر جرم مولکولی است.

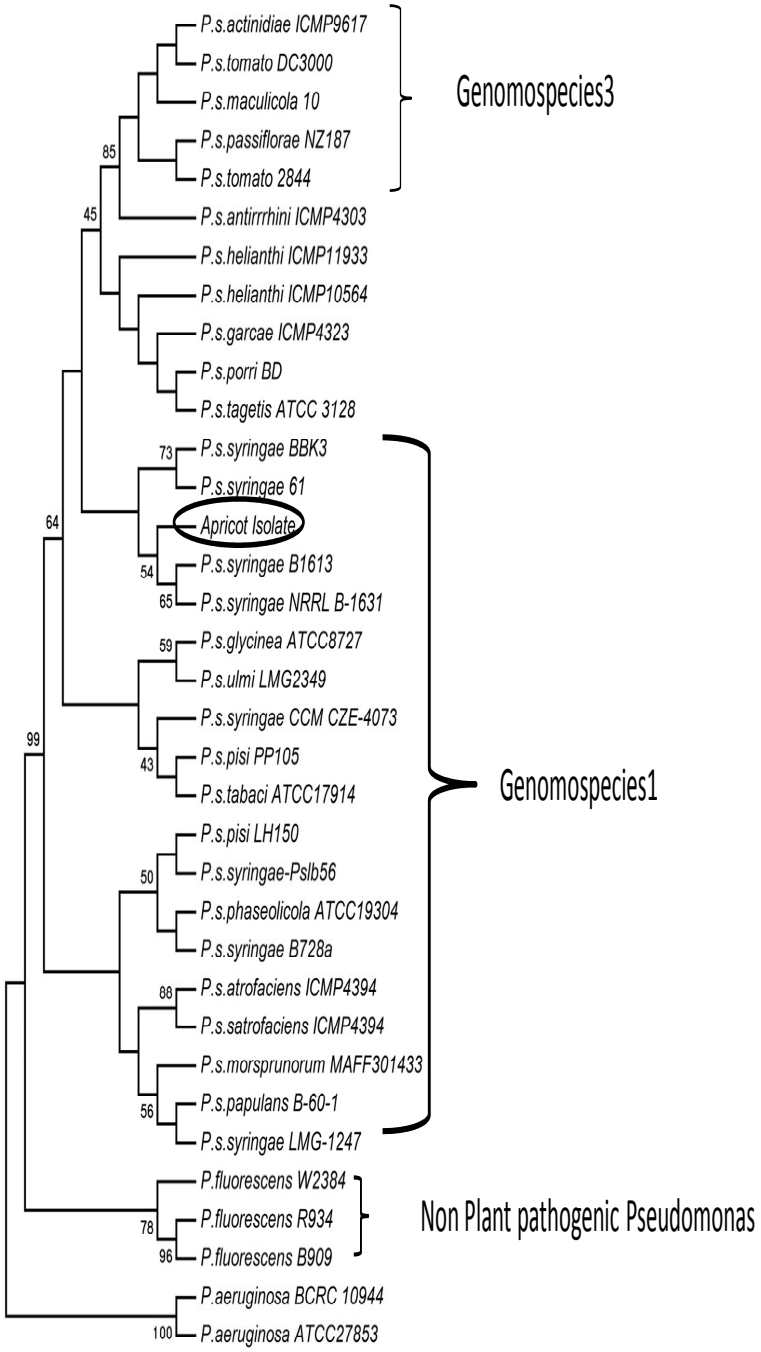
Fig. 3. The 720 bp fragment from the *syrB* gene. Lane 1, isolate number 20. Lane 2, *Pss* (IBSBF451) and Lane 3, *P. s.* pv. *maculicola* . C: water for DNA template (Negative control). M: 1500-bp DNA ladder.



شکل ۴. قطعه ٦۰۰ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه ITS در نمایندگانی از جدایه‌های به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار کرمان به‌ترتیب از ۱ تا ۵ شامل جدایه‌های هلو، ۶ تا ۱۲ جدایه‌های آلو و ۱۳ تا ۱۷ جدایه‌های زردآلو، ستون ۱۸ مربوط به جدایه مرجع(IBSBF451) *Pss*، M نشانگر جرم مولکولی و C کنترل منفی است.

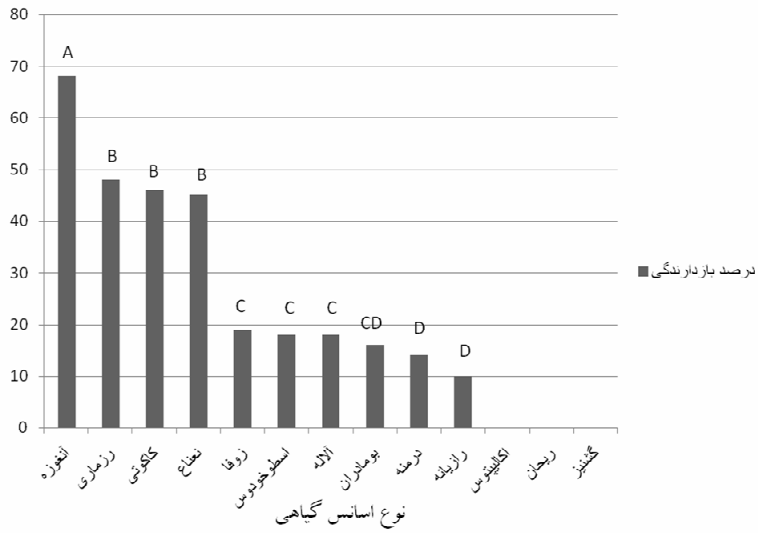
Fig.4. The 600 bp fragment of the ITS from some stone fruit trees in kerman province, pear isolates (Lane 1 to 5), apricot isolates (Lane 6 to 12) and plum isolates (Lane 13 to 17) and *Pss* IBSBF451 (lane 18) respectively. C: water for DNA template (Negative control). M: 1500-bp DNA ladder.

الداغی و همکاران (Aldaghi *et al.* 2010) مطابقت داشت. هم‌چنین *جونز و همکاران* (Jones *et al.* 1993) در یک مطالعه ۷۷ استرین از هشت پاتووار این‌گونه مورد بررسی فنوتیپی قرار دادند و مشخص گردید که پاتووارها بسیار به یکدیگر نزدیک بوده و تفکیک آنها مشکل است، اما استرین‌های متعلق به پاتووارهای *P. s.* pv. *syringae*، *P. s.* pv. *phaseolicola* و *P. s.* pv. *tomato*، *P. s.* pv. *tabaci* در خوشه‌های جداگانه طبقه‌بندی شدند. به نظر می‌رسد توجه به نوع علایم و دامنه میزبانی برای شناسایی پاتووارها، به عنوان معیار اصلی در تمایز آنها کاربرد دارد (Dye *et al.* 1980). این مسأله به‌خصوص در مطالعاتی که به منظور شناسایی یا بررسی تنوع ژنتیکی گروه یا گروه‌هایی از باکتری‌های بیماری‌زا انجام شده لحاظ گردیده و همواره تلاش شده است تا با استفاده از روش‌های دیگر و تلفیق اطلاعات حاصله به درک درستی از روابط اجدادی میان گروه‌هایی از باکتری‌ها که از نظر تاکسونومیکی پیچیده هستند، رسید. ویژگی فنوتیپی خاصی برای تشخیص دقیق اعضا گونه‌های ژنومی وجود ندارد. فقدان این‌گونه ضوابط برای تفکیک گونه‌های ژنومی ارتباطی به تعریف گونه در باکتری‌ها ندارد بلکه



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش **Neighbor joining**، نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی جدایه‌های بیماری‌زا در هسته‌داران در مقایسه با تعدادی از پاتووارهای مهم ***Pseudomonas syringae*** براساس تشابه توالی ناحیه **ITS**

Fig. 5. Neighbor-joining tree based on a ITS sequences of a representatives pathogenic isolates inciting stone fruit canker comparing with some type strains of related *Pseudomonas syringae* pathovars.



شکل ۶. میزان بازدارندگی از رشد جدایه‌های بیماری‌زا توسط اسانس‌های گیاهی، ستون‌هایی که با حروف یکسان دارند نمایش داده شده‌اند در آزمون دانکن با یکدیگر نداشتند.

Fig. 6. Inhibition of bacterial isolates by plant essentials. The Colum with same letters indicates non significant difference in Duncan study.

دلیل اصلی آن عدم تبدیل گونه‌های ژنومی به شکل یک گونه طبیعی است، بنابراین تا طراحی آزمون‌های افتراقی مفید، نظام پاتوواری در گونه *P. syringae* محفوظ خواهد ماند (Samsom *et al.* 1998). الگوی پروتئین‌های محلول سلولی باکتری‌ها منعکس‌کننده محتوی ژنتیکی آنها بوده و به‌عنوان ابزاری قابل اعتماد در شناسایی و طبقه‌بندی آنها به‌ویژه در سطح زیرگونه به شمار آمده است (Vandamme *et al*. 1996; Kersters and de Ley 1975). پروفیل پروتئینی تهیه شده از جدایه‌های *P. avellane* عامل زوال بلوط، توانایی تفکیک این جدایه‌ها را از گروه غیر بیماری‌زای این‌گونه و یا پاتووار *P. s.* pv. *syringae* که از همان درختان جدا گردیده بود، داشت. علاوه بر آن جدایه‌های به‌دست‌آمده از درختان وحشی بلوط نیز الگوی منحصر به فردی داشتند (Scortichini *et al.* 2005). شباهت الگوی پروتئینی جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار، گندم و جو قبلاً نیز گزارش شده است (Aldaghi *et al*. 2010). نتایج این بررسی نیز نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا از نظر نقوش پروتئین‌های محلول، کاملاً مشابه با پاتوتیپ syringae بوده و امکان شناسایی آنها فراهم است، تکثیر قطعه ۷۲۰ جفت بازی از ژن *syrB* نشان داد که تمامی جدایه‌های بیماری‌زا دارای پتانسیل تولید زهرابه سرینگومایسین می‌باشند. ژن *syrB* مسئول سنتز زهرابه سرینگومایسین و ایزومرهای آن است. توانایی تولید زهرابه در باکتری‌های بیماری‌زای متعددی گزارش شده و در پرآزاری آنها نقش موثری ایفا می‌کند. از این‌رو تلاش گردیده است تا با ردیابی تولید این زهرابه‌ها در محیط‌های کشت و بررسی ژن‌هایی که در فرآیند ساخت و ترشح این زهرابه‌ها دخالت دارند امکان شناسایی سریع و دقیق باکتری مولد، فراهم گردد.

استفاده از آغازگرهای اختصاصی با توجه به سهولت کار، حساسیت بالا و سرعت انجام واکنش زنجیره‌ای

پلی‌مراز به‌عنوان روش مؤثری در شناسایی این دسته از پاتووارها، مورد توجه قرار گرفته است (Weingart and Volksch 1997). ردیابی ژن‌های دخیل در تولید زهرابه به‌عنوان یکی از روش‌های شناسایی باکتری‌های دیگری مانند *P. s.* pv. *phaseolicola* نیز، کارآیی بالایی دارد (Prosen *et al.* 1993). سرینگومایسین و دیگر ایزومرهای آن زهرابه‌هایی با ساختار لیپودپسیناپپتیدی حلقوی هستند و به‌وسیله اغلب جدایه‌های پاتووار *P. s.* pv. *syringae* تولید می‌شود. گرچه تولید این زهرابه مختص به جدایه‌های این پاتووار نیست و برخی دیگر از پاتووارها و گونه‌ها مانند *P. fuscovaginae* نیز، توان تولید آن‌را دارند (Falamand *et al.* 1996). استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر ژن *syrB* که کدکننده زیر واحد کوچک این زهرابه است به‌عنوان روشی سریع و مفید در ردیابی این جدایه معرفی گردیده است (Sorensen *et al.* 1998). در ایران ریبوزومی باکتری‌ها دو ناحیه‌ای غیر رمز شونده وجود دارد که در میان ژن‌های *16s rRNA* و *23s rRNA* و دیگری در میان ژن *23s rRNA* و *5s rRNA* واقع گردیده است که به ترتیب به نام‌های ITS1(internal transcribed spacer region) و ITS2 شهرت دارند. در این نواحی ژن‌های tRNA قرار گرفته و علاوه بر آن وجود این نواحی برای رونویسی هماهنگ و آماده‌سازی رونوشت ضروری است (Gurtler 1999). در بسیاری از باکتری‌ها تفاوت و تنوع در طول و توالی این ناحیه مشاهده می‌گردد.

این مسأله عموماً با وجود یا عدم وجود ژن‌های tRNA و بلوک‌های الحاقی یا حذفی نوکلئوتیدی در ارتباط است. به نظر می‌رسد که طول و میزان تغییر نوکلئوتیدی در این ناحیه، به اندازه کافی برای تعیین قرابت فیلوژنتیک میان برخی باکتری‌ها به‌خصوص در سطح زیر گونه و استرین کارآیی دارد، زیرا این ناحیه به سبب غیرکدکننده بودن، تحت تأثیر فشار انتخابی نبوده و جهش‌های زیادی را در خود محفوظ داشته است (Tyler *et al.* 1997). درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌یابی قطعه ITS نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا در کنار اعضا گروه ژنومی یک قرار دارد. هم‌چنین تعدادی از سودوموناس‌های غیربیماری‌زا در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفتند (شکل ۶). بنابراین براساس مجموع ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی و فیلوژنتیکی، تعلق جدایه‌ها به پاتووار syringae محرز است. استفاده از گیاهان برای کنترل آفات و امراض گیاهی در کشورهای مختلف دنیا رایج است و تأثیر بالای برخی اسانس‌های گیاهی به‌وسیله محققین مختلفی گزارش شده است (Smith *et al.* 1998; Wan *et al.* 1998; (Hassanein and Eldoksch 1997 برخورداری از دو عامل مهم جغرافیایی و آب و هوایی باعث گردیده است که ایران از لحاظ پوشش گیاهی یکی از غنی‌ترین کشورهای جهان باشد.

وجود چنین تنوعی در پوشش گیاهی کشورمان و قرار داشتن بسیاری از این گیاهان بومی در زمره گیاهان دارویی مهم دنیا و توجه به وجود خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی بسیاری از این گیاهان, زمینه استفاده از آنها را در گیاه‌پزشکی فراهم آورده‌است. به نظر می‌رسد با توجه به تنوع قابل ملاحظه در میزبان‌های عامل این بیماری، امکان وجود تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های مذکور بالا است. هم‌چنین با عنایت به گزارش پاتووارهای دیگری که می‌توانند باعث بیماری شانکر در درختان میوه هسته‌دار باشند (Menard *et al.* 2003)، انجام مطالعات تکمیلی بر روی بیماری مذکور ضروری است، علاوه بر آن می‌توان امیدوار بود تا با استفاده از برخی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی و به‌خصوص با توجه به

موقعیت ممتاز ایران و به‌خصوص استان کرمان از نظر وجود طیف گسترده گیاهان دارویی امکان کنترل مؤثر بیماری فراهم شود.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ولی‌عصر (عج) به انجام رسیده‌است. نگارندگان بدین وسیله مراتب سپاس و امتنان خویش را از مسئولین محترم، به‌خصوص جناب آقای دکتر حسن رنجبر عسکری اعلام می‌دارند. هم‌چنین از جناب آقای پروفسور رحیمیان نیز، به‌دلیل در اختیار قرار دادن جدایه مرجع سپاسگزاری می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (110- 107) متن انگلیسی مراجعه شود.