

بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *Agrobacterium* از میزبان‌های مختلف
در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد*

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF
Agrobacterium ISOLATES FROM DIFFERENT HOSTS IN FARIS AND
KOHGILUYE AND BOYERAHMAD PROVINCES

محمود شهابی محمدآبادی، سید محسن تقوی** و محمد جواهری^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

چکیده

در سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از باغ‌های مو، گلخانه‌های پرورش گل رز و هم‌چنین مزارع چغندر قند در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد بازدید و از گیاهان دارای علائم گال طوقه و ریشه و خاک اطراف آنها نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی عامل بیماری روی محیط‌های *NA*، *DIM agar*، *IA* و *RS* انجام گرفت. پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، با انجام آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی جدایه‌ها به‌عنوان *A. vitis* و *A. tumefaciens biovar I* تشخیص داده شدند. آزمون بیماری‌زایی روی گیاهان کالانکوتنه، گوجه‌فرنگی و آفتابگردان انجام شد و اکثر جدایه‌ها توانستند در این گیاهان تولید گال کنند. برای تشخیص بیماری‌زایی جدایه‌ها نیز از آغازگرهای اختصاصی *A/C* و *VCF/VCR* استفاده شد که به‌ترتیب تمام جدایه‌ها باندهای ۲۲۴ و ۷۳۰ جفت بازی را تکثیر کردند. در بررسی آزمون *rep-PCR* با استفاده از آغازگرهای *BOX* و *ERIC* تنوع زیادی در بین جدایه‌ها مشاهده گردید. جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق مختلف استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد به دو گروه کلی قابل تقسیم بودند. گروه یک نیز به دو زیر گروه تقسیم شد، که یک زیر گروه شامل جدایه‌های *A. vitis* (جدا شده از درختان مو) و زیر گروه دیگر شامل جدایه‌های *A. tumefaciens* (جدا شده از رز و چغندر قند) بود. گروه دوم نیز تعداد کمی از جدایه‌های *A. tumefaciens* (جدا شده از رز و چغندر قند) را شامل شد. حداکثر شباهت در آزمون *rep-PCR* در داخل گونه *A. vitis* با حدود ۸۸ درصد به‌دست آمد. گروه‌بندی براساس خصوصیات ژنوتیپی تا حدودی با گروه‌بندی براساس خصوصیات فنوتیپی مطابقت داشته و آزمون‌های فنوتیپی و *rep-PCR* به خوبی توانستند گونه‌های *A. vitis* و *A. tumefaciens* را از هم تفکیک نمایند.

واژه‌های کلیدی: گال طوقه و ریشه، *Agrobacterium* *rep-PCR*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir

۱. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

بیماری گال طوقه و ریشه یکی از بیماری‌های مهم گیاهان بوده و توسط گونه‌های *Agrobacterium* ایجاد می‌شود. گونه‌های مختلف آگروباکتریوم معمولاً به‌عنوان باکتری‌های خاکزاد شناخته شده که بیش از ۹۰ خانواده مختلف گیاهی شامل درختان میوه، خشکبار، گیاهان زینتی و خزنده (گل رز، شمشاد، داوودی و کوکب) را آلوده می‌کنند (Bradbury 1986; Schaad et al 2001). در اثر آلودگی گیاه به استرین‌های بیماری‌زای آگروباکتریوم، سلول‌ها بیش از حد تکثیر می‌شوند که منجر به تشکیل تومور (گال) طوقه و یا ریشه‌های نابجای بیش از حد (ریشه مویی) می‌گردد. گال طوقه هم‌چنین از رشد گیاهان بالغ به دلیل کاهش توسعه سیستم ریشه یا اختلال در جریان آوندی گیاهان جلوگیری می‌کند. ضررهای مالی ناشی از بیماری گال طوقه و ریشه میلیون‌ها دلار در سال تخمین زده شده است (Schaad et al. 2001). این بیماری عمدتاً در نهالستان‌ها مهم بوده زیرا گیاهان آلوده غیرقابل فروش می‌شوند (Rhouma et al. 2006).

ایجاد گال در گیاه توسط یک پلاسمید حلقوی موجود در سلول باکتری، به نام pTi (tumor inducing plasmid) کنترل می‌شود. بخشی از این پلاسمید که T-DNA (Transferred DNA) نامیده می‌شود، به ژنوم گیاه منتقل و باعث تولید مقدار زیادی هورمون‌های رشد گیاهی (اکسین و سیتوکینین) در محل نفوذ باکتری می‌شود، که این امر سبب تکثیر و رشد بیش از حد سلول‌های گیاهی و بروز گال می‌شود (Miranda et al. 1992; Ream 1989; Thomashow et al. 1980). اولین بار این باکتری توسط از موه‌های آلوده جداسازی شد و سپس اسمیت و تاونسند (Smith and Townsend 1907) باکتری عامل بیماری را شناسایی و آنرا

Bacterium tumefaciens نامگذاری کردند. برگگی و همکاران (Bergy et al. 1923) نام باکتری را به *Phytomonas tumefaciens* تغییر دادند و در سال ۱۹۴۲ Conn مجدداً نام باکتری را تغییر داده و آن را *A. tumefaciens* نامید (Conn 1942; Skerman et al. 1980).

طبقه‌بندی آگروباکتریوم سال‌ها براساس خصوصیات بیماری‌زایی صورت می‌گرفت، سپس این طبقه‌بندی براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی به بیوتا‌یپ I و II تغییر یافت. طبقه‌بندی بر پایه خصوصیات ژنتیکی آگروباکتریوم‌ها را به سه بیووار تقسیم نمود و در نهایت بیووار ۱، ۲ و ۳ به ترتیب *A. tumefaciens*، *A. rhizogenes* و *A. rubi* نامیده شدند (Bouzar and Jones 2001). در سال ۲۰۰۱ یانگ و همکاران براساس توالی بازهای آلی ژن 16S rRNA، تمام گونه‌های بیماری‌زای این جنس را به استثنای گونه شاخص *A. tumefaciens* در جنس جدید *Rhizobium* نام‌گذاری نمودند، که این کار با اعتراض فراند و همکاران (Farrand et al. 2003) و امضای بیش از ۱۰۰ باکتری‌شناس مواجه شد، زیرا مقایسه صفات کلاسیک و مولکولی گونه‌های شناخته شده جنس آگروباکتریوم نشان می‌داد که بیووار یک و سه آن متفاوت از جنس *Rhizobium* بوده و بیووار دو نیز علی‌رغم تشابه بسیار نزدیک با گونه‌های *Rhizobium*، تعامل متفاوتی با گیاهان میزبان دارد. سرانجام یانگ و همکاران (Young et al. 2003 and 2004a) با رد همه ایرادات، وجود مجموعه واحد *Rhizobium* را تأیید کردند. طبق آخرین فهرست اسامی معتبر باکتری‌ها (Young et al. 2004b; Euzéby 2004) اسامی جدید گونه‌های بیماری‌زای گیاهی جنس *Rhizobium* به قرار زیر است.

پراکندگی گسترده این بیماری در اکثر نقاط ایران، تعیین گونه‌های موجود، تنوع فنوتیپی، سرولوژیکی و ژنوتیپی جدایه‌های *Agrobacterium* در مناطق مختلف کشور مورد توجه بوده است. به دلیل پراکندگی گسترده این بیماری در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد و لزوم انجام تحقیق روی تنوع ژنوتیپی عوامل بیماری در این استان‌ها، این تحقیق با هدف بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *Agrobacterium* با استفاده از rep-PCR انجام شد.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

طی فصول مختلف سال، باغ‌های مو و گلخانه‌های تولید گل رز و مزارع چغندر قند در مناطق مختلف استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد مورد بازدید قرار گرفته و از گیاهان آلوده نمونه‌برداری صورت گرفت. از خاک اطراف گیاهان آلوده و شیره درختان نیز نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها درون کیسه‌های کاغذی و سپس کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و در شرایط خشک و خنک به آزمایشگاه منتقل شد.

الف) جداسازی عامل بیماری از گال

گال‌های جوان، ریز، سفید و نرم از گیاهان مبتلا جدا و توسط آب معمولی شستشو داده شد. بافت‌های مرده و قهوه‌ای که روی بعضی گال‌ها وجود داشتند از سطح گال‌ها جدا گشته و گال‌ها به مدت پنج دقیقه در مایع سفیدکننده (هیپو کلریت سدیم) ۲۰٪ ضد عفونی و سپس توسط آب مقطر سترون شستشو گردید. گال‌های ضد عفونی شده در هاون‌های سترون همراه

- *R. radiobacter* (= *A. radiobacter*)
- *R. rhizogenes* (= *A. rhizogenes*)
- *R. larrymoorei* (= *A. larrymoorei*)
- *R. rubi* (= *A. rubi*)
- *R. vitis* (= *A. vitis*)

به این ترتیب نام شناخته شده *A. tumefaciens* به *R. radiobacter* تغییر یافت. ولی با توجه به اینکه *Agrobacterium* از لحاظ مکانیسم بیماری‌زایی و تعامل با گیاه با *Rhizobium* تفاوت داشته و برای بیماری‌شناسان گیاهی و متخصصین مهندسی ژنتیک، نام *Agrobacterium* آشنا تر است کماکان از نام *Agrobacterium* استفاده کرده و هنوز هم اکثریت بیماری‌شناسان گیاهی نام *A. tumefaciens* را به کار می‌برند.

در ایران بیماری گال طوقه مو برای اولین بار در سال ۱۳۳۷ در تاکستان‌های ارومیه مشاهده گردید و در سال ۱۳۴۵ عامل این بیماری از موهای آلوده در منطقه بوئین زهرای قزوین جداسازی و شناسایی شد (Amani 1966). فاتحی و همکاران گونه *A. vitis* را از موستان‌های مناطق کرج و تاکستان جداسازی و شناسایی نمودند (Fatehi et al. 1998). آل یاسین و بنی هاشمی (Banihashemi and Aleyasin 1993) و صلاحی اردکانی و همکاران (Salahi Ardakani et al. 2000) عامل بیماری گال طوقه را از موهای استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد جداسازی و شناسایی نمودند. تقوی و گل خندان (Taghavi and Golkhandan 2005) عامل بیماری سرطان گالی چغندر قند را از چغندرهای استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد جداسازی و شناسایی کردند. صالحی و همکاران (Salehi et al. 2006) تنوع جدایه‌های *A. tumefaciens* در ایران را با استفاده از الگوی نقوش پروتئینی جدایه‌ها و آزمون BOX-PCR مورد بررسی قرار دادند. با توجه به اهمیت اقتصادی و

ج) جداسازی عامل بیماری از شیر گیاهی مو
 عصاره گیاهی از آوند چوبی گیاهان دارای علائم و فاقد
 علائم با دو روش تهیه شد. روش اول در ابتدای فصل
 بهار هنگامی که جوانه‌ها متورم شده بودند به‌کار گرفته
 شد. در این موقع جریان شیر گیاهی شدید و به‌گریه
 مو مشهور است. جهت تهیه مایع آوندی ساقه در حدود
 ۱۰ سانتی‌متری بالاتر از محل گال، به‌وسیله الکل اتیلیک
 ۹۶ درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس به‌وسیله
 اسکالپل، زخمی نسبتاً عمیق، در شاخه گیاه ایجاد
 گردید. پس از خروج چند قطره از شیر گیاهی،
 به‌وسیله سرنگ سترون، مقداری از شیر گیاهی جدا و
 به شیشه‌های سترون منتقل و در دمای 4°C نگهداری
 شد. در روش دیگر سطح خارجی شاخه‌های جوان در
 آزمایشگاه به‌وسیله الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی و
 سپس به‌وسیله انبردست سترون فشرده شدند تا چندین
 قطره شیر آوندی خارج گردید. مایع آوندی به‌دست
 آمده از دو روش فوق بر روی محیط کشت RS کشت
 داده شده و تست‌ها در دمای 27°C به‌مدت پنج روز
 نگهداری گردید. پرگنه‌های شبیه به *Agrobacterium*
 با مرکز قرمز و حاشیه سفید روی این محیط کشت
 انتخاب و پس از خالص‌سازی روی محیط کشت NA،
 در صورت گرم منفی بودن و عدم تولید رنگ فلورسنت
 روی محیط King's B برای انجام سایر آزمون‌ها در
 دمای 4°C نگهداری شدند.

۲- بررسی خصوصیات فنوتیپی و تغذیه‌ای جدایه‌ها

آزمون‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی
 انجام شد (Schaad et al. 2001). از محیط کشت‌های
 انتخابی شامل 1A، RS، 2E و همچنین آزمون‌های افتراقی
 شامل تولید ۳-کتولاکتوز، رشد در 35°C ، اثر روی شیر

مقداری آب سترون کاملاً له گشته و به‌مدت ۶۰-۳۰
 دقیقه در محیط آزمایشگاه بدون حرکت قرار داده شد.
 به‌وسیله یک لوپ سترون چند قطره از عصاره حاصله
 روی محیط کشت‌های DIM agar (Schaad et al. 2001)
 و (Nutrient Agar) NA و (PDA) Potato (Dextrose Agar)
 کشت داده شد و تست‌ها در دمای 27°C تا ظهور پرگنه‌های
 باکتریایی نگهداری گردید. پس از رشد باکتری‌ها،
 پرگنه‌های شبیه به *Agrobacterium* (پرگنه‌های برجسته،
 مدور، براق، به رنگ سفید شیری یا بژ از روی محیط‌های
 PDA و NA و پرگنه‌های آبی از روی محیط DIM agar
 انتخاب و هر پرگنه به‌صورت جداگانه روی محیط‌های انتخابی
 Roy & Sasser) RS، 1A و 2E به‌صورت جداگانه
 کشت داده شد (Roy & Sasser 1983; Brisbane & Kerr 1983).

ب) جداسازی عامل بیماری از خاک

یک گرم از هر نمونه خاک جمع‌آوری شده در ۱۰
 میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. نمونه‌ها به‌مدت
 ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شده و سپس
 به‌صورت ساکن به‌مدت ده دقیقه در شرایط آزمایشگاه
 گذاشته شد تا ذرات جامد سنگین خاک ته‌نشین گردند.
 چند قطره از مایع رویی محلول روی محیط کشت‌های
 RS و 1A کشت داده شد و تست‌ها در دمای 27°C
 تا ظهور پرگنه‌ها نگهداری شدند. پرگنه‌های شبیه
 به *Agrobacterium* (با مرکز قرمز و حاشیه سفید روی
 محیط کشت RS و با مرکز قهوه‌ای و حاشیه سفید روی
 محیط کشت 1A) انتخاب و پس از خالص‌سازی روی
 محیط NA، جهت انجام آزمون‌های بعدی، در یخچال
 نگهداری شدند.

و '3'-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-5' (C') و طراحی شده براساس نواحی *virD2* (Hass et al. 1995) و VCF/VCR (VCF: 5'-ATCATTGTAGCGACT-3') و VCR: 5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3') طراحی شده براساس نواحی *virC2/virC1* (Sawada et al. 1995) استفاده شد.

سوسپانسیونی از باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml (چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت دو دقیقه در دور ۱۱۰۰۰g سانتریفیوژ شده و از فاز رویی مستقیماً در PCR استفاده شد. میزان مواد مورد استفاده $0.4 \mu\text{M}$ MgCl₂، $1/5 \text{ mM}$ از هر یک از آغازگرها، 0.2 mM dNTPs، $1/25 \text{ U}$ آنزیم *Tag DNA* پلی مراز و $2/5 \mu\text{L}$ بافر $10\times$ PCR به اضافه $2 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون جوشانده باکتری بود. چرخه حرارتی برای آغازگرهای A/C' با واسرشت سازی اولیه در دمای 94°C به مدت یک دقیقه آغاز و سپس 40 چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای 94°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای 54°C به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای 72°C به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت پنج دقیقه و برای آغازگرهای VCF/VCR با واسرشت سازی اولیه در دمای 95°C به مدت دو و نیم دقیقه آغاز و سپس 40 چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای 95°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای 51°C به مدت یک دقیقه، امتداد در دمای 72°C به مدت دو دقیقه و در نهایت یک سیکل امتداد نهایی در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه انجام شد (Hass et al. 1995; Sawada et al. 1995). به منظور بررسی طول قطعات تکثیر شده، ژل آگارز یک درصد تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر 1kb (تهیه

لیتموس، تولید اسید از ساکاروز، اریتریتول، ملوزیتوز، تولید قلیا از اسید مالونیک، اسید پروپیونیک، اسید میوسیک و اسید ال- تارتاریک، رشد و تولید رنگدانه روی فریک آمونیوم سیترات و مصرف ال- تایروزین برای تمایز *A. vitis* و *A. rhizogenes* *A. tumefaciens* گردید (Schaad et al. 2001; Roy & Sasser 1983; Brisbane & Kerr 1983; Fahy & Perseley 1983).

۳- آزمون بیماری زایی

جهت انجام این آزمون، ابتدا گیاهان آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، کالانکوه (*Bryophyllum daigremontianum* L.) و گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.) در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شدند، و پس از ۳ تا ۴ هفته آزمون بیماری زایی روی آنها انجام گردید. ابتدا به وسیله الکل اتیلیک، محل مایه زنی ضد عفونی و سپس به وسیله یک سوزن باریک، از کشت ۲۴ ساعته، باکتری به ساقه این گیاهان مایه زنی شد. به منظور حفظ رطوبت محل زخم با پنبه مرطوب و پارافیلیم برای چند روز پوشیده شد. در تمامی موارد، گیاهان شاهد نیز با آب مقطر سترون مایه زنی و به وسیله پنبه مرطوب و پارافیلیم محل زخم پوشیده شد. پس از ۲۰ روز، علایم روی گیاهان مورد بررسی قرار گرفت (Djavaheri and Mohammadi 2000; Salahi Ardekani et al. 2000).

۴- تشخیص گونه‌های بیماری زای باکتری

Agrobacterium با آغازگرهای اختصاصی

برای تشخیص گونه‌های بیماری زای باکتری *Agrobacterium* از آغازگرهای اختصاصی A/C' (A: 5'- ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3')

تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر 1kb (تهیه شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌های آن بارگذاری و به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از آن با استفاده از اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) رنگ‌آمیزی صورت گرفت و با استفاده از دستگاه Gel Documentation از آن عکسبرداری شد. سپس وزن مولکولی قطعات تکثیر شده به صورت چشمی اندازه‌گیری شد.

۶- آنالیز داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی

فاصله ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Numerical Taxonomy & Multivariate Analysis System (Ntsys-pc 2.02) رسم گردید (Rohlf 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم وجود نوار در ژل مشخص شد. خصوصیات فنوتیپی به صورت کدهای یک (برای خصوصیات مثبت) و صفر (برای خصوصیات منفی) و خصوصیات ژنوتیپی به صورت کدهای یک (برای وجود باند) و صفر (برای عدم وجود باند) در این نرم‌افزار تعریف شد. بر پایه خصوصیات فنوتیپی و خصوصیات ژنوتیپی، دندروگرام مربوط به ۳۰ جدایه توسط این نرم‌افزار رسم شد. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، براساس کلیه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

۱- جداسازی عامل بیماری و بررسی خصوصیات

فنوتیپی جدایه‌ها

از گیاهان مو، گل رز و چغندر قند دارای علائم گال طوقه و هم‌چنین شیره آوندی گیاه مو دارای علائم گال، یک

شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌های آن بارگذاری و به مدت یک ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شد. پس از آن با استفاده از اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) رنگ‌آمیزی صورت گرفت و با استفاده از دستگاه Gel Documentation Tajhiz, Company (Aran) از advanced laboratory and medical equipment آن عکسبرداری شد.

۵- آزمون rep-PCR

جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری *Agrobacterium* از روش rep-PCR برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده استفاده گردید. از آغازگرهای BOXAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')، ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') و ERIC2 (5'-AAGTAAGTgACTGGGGTGAGCG-3') به این منظور استفاده شد (Versalovic et al. 1991; 1994). میزان مواد مورد استفاده ۱/۶ mM MgCl₂، ۰/۴ μM از هر یک از آغازگرها، ۰/۲ mM dNTPs، ۲/۵U آنزیم *Tag DNA* پلی‌مراز و ۲/۵ μL بافر PCR ×10 به اضافه ۲ μL از سوسپانسیون جوشانده باکتری بود. واسرشت‌سازی اولیه در دمای C ۹۵ به مدت دو دقیقه آغاز و سپس ۳۰ تا ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA در دمای C ۹۴ به مدت یک دقیقه و C ۹۲ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای C ۵۲ (برای آغازگر BOXAIR) و دمای C ۵۳ (برای آغازگرهای ERIC1R و ERIC2) به مدت یک دقیقه، امتداد در دمای C ۷۲ به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه امتداد نهایی در دمای C ۷۲ به مدت پنج دقیقه انجام شد (Versalovic et al. 1991). به منظور بررسی قطعات تکثیر شده در آزمون rep-PCR ژل آگارز ۱/۵ درصد

نیترا را داشتند. سایر جدایه‌ها از نظر این خصوصیت منفی بودند. جدایه‌های شماره ۲، ۱۲ و ۱۶ (*A. vitis*) و جدایه‌های شماره ۱۷، ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۲۵ (*A. tumefaciens* biovar 1) نتوانستند آنزیم اوره آز تولید کنند ولی سایر جدایه‌ها از نظر تولید این آنزیم مثبت بودند. در منابع این خصوصیت برای جنس *Agrobacterium* معمولاً مثبت ذکر گردیده است (Bouzar et al. 1993; Fahy & Persley 1983;) (Schaad et al. 2001). تمام جدایه‌ها شیر لیتاموس را قلیایی کردند، ولی زمان تغییر رنگ توسط جدایه‌ها در این آزمون متفاوت بود.

جدایه‌های ۵، ۱۰ و ۱۳ (*A. vitis*) قادر به استفاده از قند ساکاروز نبودند، ولی بقیه جدایه‌ها توانستند از این قند در محیط کشت استفاده کنند و رنگ محیط را تغییر دهند. در منابع نیز این خصوصیت برای *A. tumefaciens* biovar 1 مثبت و برای *A. vitis* متغیر اعلام شده است (Schaad et al. 2001). هم‌چنین جدایه‌های ۱۱ و ۱۵ (*A. vitis*) قادر به تولید قلیا از اسید پروپیونیک بودند، که در منابع این خصوصیت برای *A. vitis* منفی ثبت گردیده، ولی این نتیجه با نتیجه جواهری (Djaveheri 2000) مطابقت داشت. این خصوصیات نشان می‌دهد، که جدایه‌های مختلف *A. vitis* و *A. tumefaciens* biovar 1 همگن نبوده و در تعدادی از آزمون‌ها با هم اختلاف داشتند. همبستگی خاصی بین تمایز فنوتیپی و محل جمع‌آوری آنها وجود نداشت.

۲- آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی

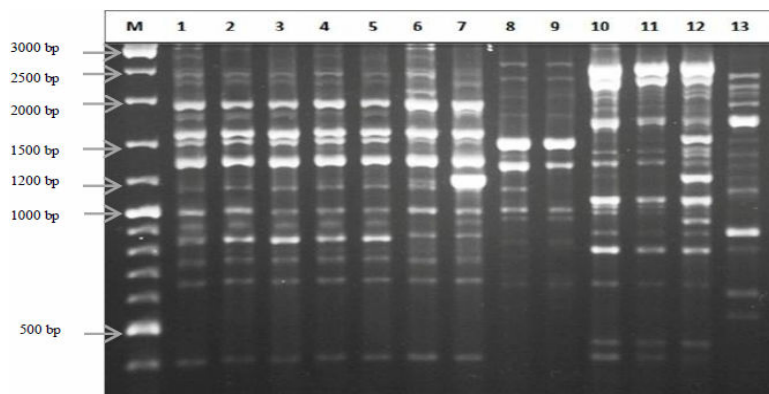
براساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02 جدایه‌های باکتری

باکتری گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت جدا شد، که براساس نتایج سایر آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی از جمله تولید ۳-کتولاکتوز، رشد در نمک طعام ۲ درصد و دمای ۳۵ °C، فعالیت روی شیر لیتاموس، تولید اسید از ملوزیتوز، دولسیتول و ساکاروز، واکنش مثبت در آزمون‌های هیدرولیز آرژنین، واکنش منفی در هیدرولیز ژلاتین و تولید یا عدم تولید گاز H₂S به‌عنوان باکتری *Agrobacterium* تشخیص داده شد. براساس آزمون‌های افتراقی و هم‌چنین با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی شامل 1A و RS، جدایه‌های درختان مو به‌عنوان *A. vitis* (۱۶ جدایه) و جدایه‌های گیاهان گل رز و چغندر قند به‌عنوان *A. tumefaciens* biovar 1 (۱۴ جدایه) تشخیص داده شد (Schaad et al. 2001). مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است. از سی جدایه به‌دست آمده از گال و شیره آوندی جدایه‌های شماره ۴، ۷، ۹ و ۱۲ (*A. vitis*) و جدایه‌های شماره ۱۹، ۲۱ و ۲۹ (*A. tumefaciens* biovar 1) از نظر تولید H₂S با خصوصیات ذکر شده در منابع متفاوت بودند، چون که این خصوصیت برای *A. vitis* منفی و برای *A. tumefaciens* biovar 1 مثبت ذکر شده است (Fahy & Persley 1983; Goto 1992).

جدایه‌های ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۹ (*A. vitis*) تولید ۳-کتولاکتوز نمودند، ولی بقیه جدایه‌های *A. vitis* از نظر این خصوصیت منفی بودند. در اکثر منابع، این خصوصیت برای *A. vitis* منفی ذکر شده است (Fahy & Persley 1983; Goto 1992). هرچند که بعضی منابع، این خصوصیت را برای *A. vitis* متغیر اعلام کرده‌اند (Schaad et al. 2001). جدایه‌های مختلف باکتریایی، از نظر احیای نیترا با هم تفاوت داشتند، به‌طوری‌که جدایه‌های شماره ۲، ۳ و ۱۲ (*A. vitis*) و جدایه‌های ۱۹، ۲۳، ۲۶ و ۲۷ (*A. tumefaciens* biovar 1) قدرت احیا

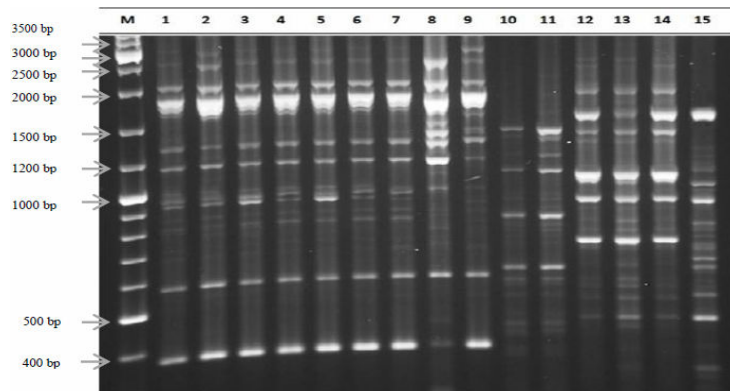
جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Agrobacterium* جدا شده از گیاهان مو، گل رز و چغندر قند در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد
Table 1. Characteristics of *Agrobacterium* strains, isolated from grapevine, rose and sugar beet in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces.

<i>Agrobacterium</i> Species	نام گیاه (Natural Host)	شماره جدایه (Strain No.)
<i>A. vitis</i>	مو (grapevin)	1
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	2
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	3
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	4
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	5
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	6
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	7
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	8
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	9
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	10
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	11
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	12
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	13
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	14
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	15
<i>A. vitis</i>	مو (grapevine)	16
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	17
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	18
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	19
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	20
<i>A. tumefaciens</i>	چغندر قند (sugar beet)	21
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	22
<i>A. tumefaciens</i>	چغندر قند (sugar beet)	23
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	24
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	25
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	26
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	27
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	28
<i>A. tumefaciens</i>	گل رز (rose)	29
<i>A. tumefaciens</i>	چغندر قند (sugar beet)	30



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های آگروباکتریوم با استفاده از آغازگر BOXA1R-M مارکر (1kb DNA ladder تهیه شده از شرکت Fermentas) چاهک‌های ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷- جدایه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۳ و ۱۵ (*A. vitis*) چاهک‌های ۸ و ۹ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳- جدایه‌های شماره ۱۹، ۲۲، ۲۰، ۲۳، ۲۶ و ۱۸ (*A. tumefaciens*)

Fig. 1. rep-PCR fingerprinting from genomic DNA of *Agrobacterium* isolates using BOXA1R primer. M: DNA molecular size marker (1kb DNA ladder; Fermentas). Lines 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7- isolates 1, 2, 3, 4, 5, 13 & 15 (*A. vitis*). Lines 8, 9, 10, 11, 12, 13- isolates 19, 22, 20, 23, 26 & 18 (*A. tumefaciens*).

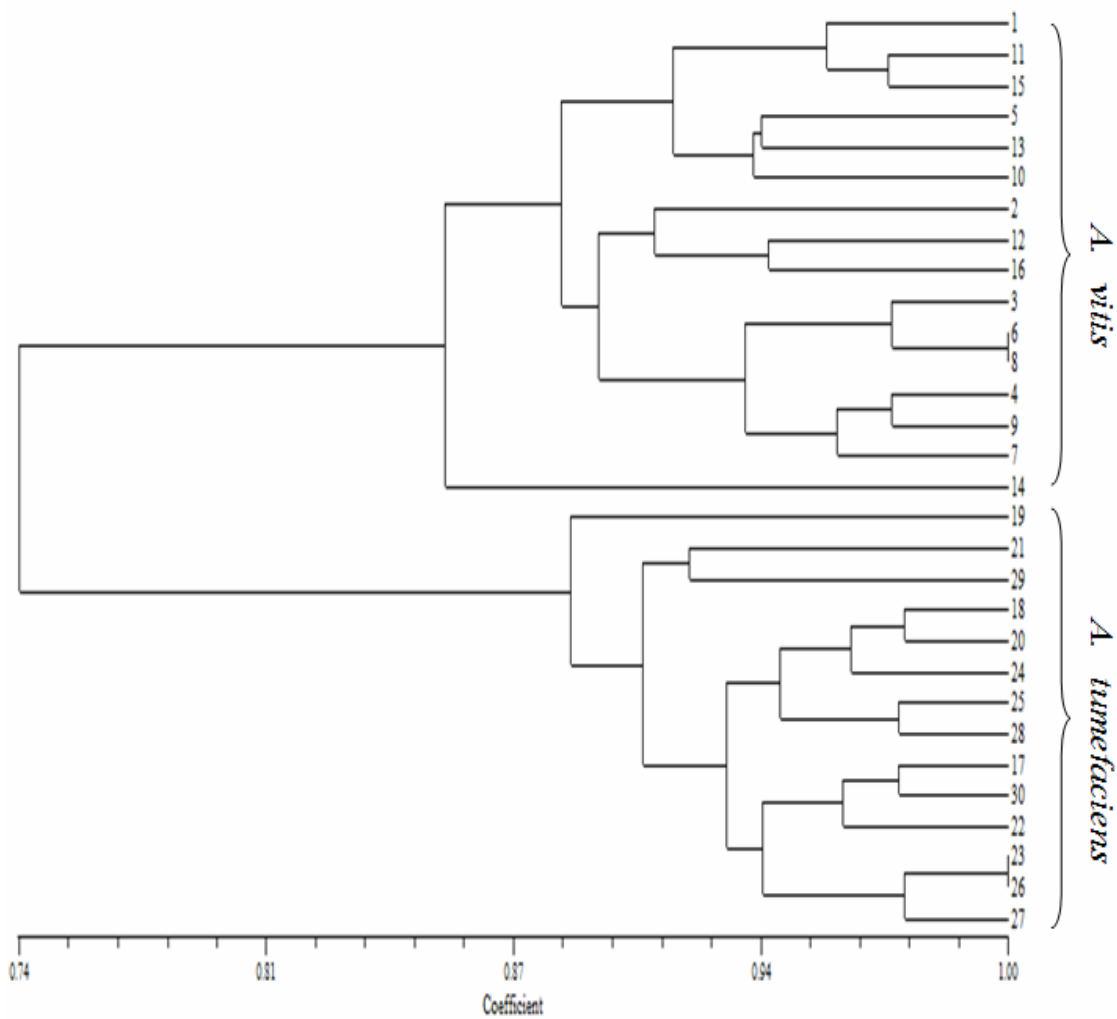


شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های آگروباکتریوم با استفاده از جفت آغازگر ERIC1R/ERIC2-M مارکر (1kb DNA ladder تهیه شده از شرکت Fermentas) چاهک‌های ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ و ۹- جدایه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۳ و ۱۵ (*A. vitis*) چاهک‌های ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۵- جدایه‌های شماره ۱۹، ۲۲، ۲۰، ۲۳، ۲۶ و ۱۸ (*A. tumefaciens*)

Fig. 2. rep-PCR fingerprinting from genomic DNA of *Agrobacterium* isolates using ERIC1R/ERIC2 primer. M: DNA molecular size marker (1kb DNA ladder; Fermentaz). Lines 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9- isolates 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13 & 15 (*A. vitis*). Lines 10, 11, 12, 13, 14, 15- isolates 19

شباهت می باشد (شکل ۳). براساس تحقیق صلاحی اردکانی و همکاران (Salahi Ardakani et al. 2000) گونه غالب بر روی درختان مو بوده، هرچند که *A. vitis* نیز روی درختان مو می‌تواند ایجاد گال نماید، در این تحقیق نیز *A. vitis* در مناطق نمونه‌برداری

Agrobacterium با ۷۴ درصد شباهت در دو گروه قرار گرفتند. گروه یک شامل جدایه‌های *A. vitis* که از درختان مو جدا شده بود با ۸۵ درصد شباهت و گروه دوم شامل جدایه‌های *A. tumefaciens* biovar 1 که از میزبان‌های گل رز و چغندر قند جدا شده بود با حدود ۸۹ درصد



شکل ۳. دندروگرام رسم شده براساس خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های آگروباکتریوم با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02 (مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است).

Fig. 3. A dendrogram based on phenotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates using Ntsys-pc version 2.02 software (Characteristics of *Agrobacterium* isolates are listed in Table1.).

تولید گال نکرد، درحالی‌که جدایه شماره ۱۹، علاوه بر گیاه کالانکوته روی گیاهان آفتابگردان و گوجه‌فرنگی نیز ایجاد گال کرد. بنابراین برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *A. vitis* و *A. tumefaciens* نباید به یک یا دو گیاه اکتفا کرد، زیرا ممکن است جدایه مذکور روی این گیاهان بیماری‌زا نباشد ولی روی گیاهان دیگری قدرت بیماری‌زایی داشته باشد. تفاوت در دامنه میزبانی جدایه‌ها

فراوانی و پراکندگی بیشتری داشت.

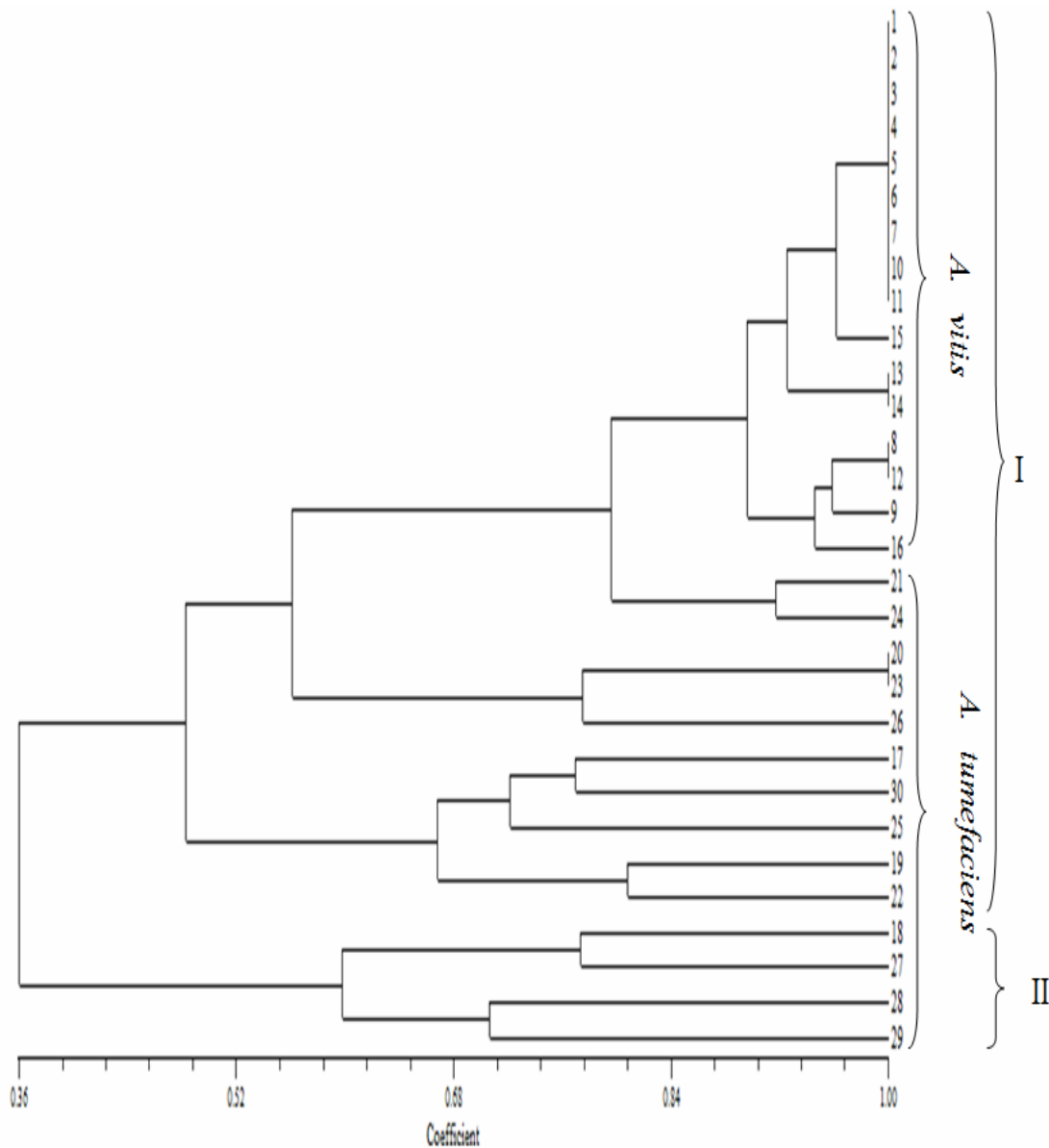
۳- اثبات بیماری‌زایی و تشخیص گونه‌های بیماری‌زای *Agrobacterium* با آغازگرهای اختصاصی

ایجاد بیماری روی میزبان‌های مختلف در بین جدایه‌ها متفاوت بود. به‌عنوان مثال جدایه شماره ۸، فقط روی گیاه کالانکوته بیماری‌زا بود و روی آفتابگردان و گوجه‌فرنگی

می‌تواند به عوامل بسیاری از جمله زمینه کروموزومی باکتری، زمینه کروموزومی گیاه، سازگاری ژنتیکی بین باکتری و گیاه، چگونگی الحاق T-DNA به ژنوم گیاه و بیان ژن‌های بیماری‌زای باکتری و پلاسمید Ti بستگی داشته باشد. تحقیقات ناوف و همکاران (Knauf et al. 1982) نیز نشان داده عوامل متعددی از جمله پلاسمید Ti، زمینه کروموزومی باکتری و تنوع ژنتیکی میزبان در تعیین دامنه میزبانی نقش دارند. در بعضی موارد، تعدادی از جدایه‌ها روی هیچ‌کدام از گیاهان مورد آزمون ایجاد گال نکردند (جدایه‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۶ از *A. vitis* و جدایه‌های ۲۲، ۲۵، ۲۹ و ۳۰ از *A. tumefaciens* biovar 1)، که شاید مربوط به عدم سازگاری بین بیمارگر و گیاهان استفاده شده در این تحقیق بوده است. هم‌چنین در این آزمون همبستگی زیادی بین گونه باکتری، میزبان و گیاه مورد استفاده در آزمون بیماری‌زایی دیده نشد ولی در اکثر موارد ایجاد گال توسط جدایه‌های *A. tumefaciens* جدا شده از رز روی هر سه میزبان بیشتر از سایر جدایه‌ها بود. در تمام موارد، هم جدایه‌های بیماری‌زا و هم جدایه‌های غیربیماری‌زا در این تحقیق، قادر به تکثیر باندهای ۲۲۴ و ۷۳۰ جفت بازی با آغازگرهای اختصاصی A/C' و VCF/ VCR بودند. با توجه به اینکه آغازگرهای اختصاصی A/C' و VCF/ VCR به ترتیب براساس نواحی *virD2* و *virC2/virC1* موجود در پلاسمید Ti، طراحی شده بودند، تکثیر باندهای ۲۲۴ و ۷۳۰ جفت بازی نشان‌دهنده وجود پلاسمید Ti در این جدایه‌ها و قابلیت بیماری‌زایی و ایجاد گال توسط آنها می‌باشد.

۴- آزمون rep-PCR

در آزمون rep-PCR از دو آغازگر BOXA1R و ERIC1R/ERIC2 استفاده شد (Versalovic et al. 1994). با استفاده از آغازگر BOX1R باندهایی در محدوده ۴۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی و با استفاده از جفت آغازگر ERIC1R/ERIC2 باندهایی در اندازه‌های حدود ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل‌های ۱ و ۲). در بررسی آزمون rep-PCR تنوع زیادی در بین جدایه‌ها علی‌رغم یکسان بودن خصوصیات فنوتیپی و الگوی تغذیه‌ای آنها دیده شد. در دندروگرام حاصله جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق مختلف استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد به دو گروه کلی با ۳۶ درصد شباهت قابل تقسیم بودند. گروه یک نیز با حدود ۴۸ درصد شباهت به دو زیر گروه تقسیم شد، که یک زیر گروه شامل جدایه‌های *A. vitis* (جدا شده از درختان مو) با حدود ۸۸ درصد شباهت و زیر گروه دیگر شامل جدایه‌های *A. tumefaciens* (جدا شده از سایر میزبان‌ها) با حدود ۴۸ درصد شباهت بود. گروه دوم نیز تعداد کمی از جدایه‌های *A. tumefaciens* (جدا شده از گل‌های رز) را با حدود ۵۹ درصد شباهت شامل گردید (شکل ۴). در بررسی صالحی و همکاران (Salehi et al. 2006) به‌وسیله آزمون BOX-PCR جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق مختلف ایران به دو دسته کلی تقسیم شده و تنوع زیادی در سطح ژنوم آنها وجود داشت. تحقیقات اپستین و همکاران (Epstein et al. 1999) و صفدری و همکاران (Safdari et al. 2009) توسط آزمون‌های rep-PCR و ERIC-PCR نیز نشان دادند که جدایه‌های آگروباکتریوم در کالیفرنیا (جدا شده از درختان گردو) و ایران دارای تنوع زیادی هستند، که نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز با نتایج تحقیقات آنها مطابقت داشت. درصد تشابه پایین در بین جدایه‌ها، حتی در سویه‌های جدا شده از یک ناحیه، بیانگر ناهمگونی بالا در بین جدایه‌های آگروباکتریوم می‌باشد. براساس نتایج این تحقیق، آزمون‌های بیوشیمیایی،



شکل ۴. دندروگرام خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌های آگروباکتریوم براساس آغازگرهای BOXA1R و ERIC1R/ERIC2 با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02 (مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است).

Fig. 4. A dendrogram based on genotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates based on BOXA1R and ERIC1R/ERIC2 primers using Ntsys-pc version 2.02 software (Characteristics of *Agrobacterium* isolates are listed in Table1.).

Agrobacterium کارایی داشته و این روش‌ها مکمل یکدیگرند. هم‌چنین آزمون rep-PCR در گروه‌بندی و تعیین تنوع جدایه‌های *Agrobacterium* کارا بوده و

فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای به‌عنوان معیاری مطمئن و با دقت بالا در کنار روش‌های مولکولی، با سرعت و حساسیت بالا برای شناسایی و ردیابی جدایه‌های

واردات گل‌های رز از کشورهای مختلف به‌خصوص از کشور هلند جستجو نمود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (115 - 113) متن انگلیسی مراجعه شود.

آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOXA1R و ERIC1R/ERIC2 توانست جدایه‌های دو گونه را از هم تفکیک کند. هم‌چنین براساس آزمون rep-PCR جدایه‌های *A. tumefaciens* (جداشده از گیاهان گل رز و چغندر قند) نسبت به جدایه‌های *A. vitis* (جدا شده از مو) دارای تنوع بیشتری بودند. علت این تنوع ژنتیکی را شاید بتوان در تنوع میزبانی این‌گونه و هم‌چنین