

مقایسه خصوصیات ژنوتیپی سویه های ایرانی
Pseudomonas syringae pv. *syringae*
از میزبان های مختلف با استفاده از rep-PCR

گیلدا نجفی پور^{1*}، سید محسن تقوی²

تاریخ دریافت: 93/2/4 تاریخ پذیرش: 93/5/10

چکیده

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (Pss) با دارا بودن بیش از 180 میزبان، بعنوان یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی تلقی شده و سالیانه خسارات قابل توجهی را در سراسر دنیا به محصولات مختلف وارد می کند. به منظور بررسی خصوصیات ژنوتیپی باکتری مذکور، 58 جدایه از میزبان های مختلف شامل هسته داران، غلات، دانه داران، برخی علف های هرز و گیاهان زینتی در استان های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و اصفهان با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از این آغازگرها قطعاتی با وزن مولکولی 250 bp تا 1500bp تکثیر شد. در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC سویه ها به پنج گروه تقسیم شدند که در این گروه ها ترجیح میزبانی قابل مشاهده نبود. این نتایج نشان می دهد که با استفاده از آغازگر مذکور نمی توان سویه ها را بر اساس میزبان از یکدیگر تفکیک نمود. در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر REP نیز سویه ها به پنج گروه تقسیم شدند. در این گروه بندی علیرغم پراکندگی سویه های درختان میوه هسته دار در گروه های مختلف، بسیاری از آن ها به همراه سویه های رز، شمعدانی و پنیکر در یک گروه قرار گرفتند. اغلب سویه های غلات و سویه های درختان میوه دانه دار در گروه های جداگانه واقع شدند. این نتایج تا حدودی تأییدی بر وجود مزیت میزبانی در میان سویه های Pss می باشد. در این پژوهش استفاده از آغازگر REP در روش rep-PCR نشان داد که روش مذکور ابزار مولکولی مفیدی به منظور تمایز نسبی سویه های مختلف باکتری Pss می باشد. آنالیز خوشه ای روش سه گانه rep-PCR با استفاده از داده های قبلی حاصل از انجام BOX-PCR و داده های حاصل از انجام ERIC-PCR و REP-PCR در مطالعه حاضر، نشان داد که آنالیز ترکیبی این سه روش توانایی بیشتری در نمایش ترجیح میزبانی نسبی در میان سویه های مختلف Pss دارد.

واژه های کلیدی: ERIC-PCR، ترجیح میزبانی، *P. syringae* pv. *syringae*، rep-PCR

¹ - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گیاهپزشکی، جهرم، ایران.

² - استاد، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: g_najafipour@jia.ac.ir

مقدمه

گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall (*Ps*) با دارا بودن بیش از 57 پاتووار، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های موجود در جنس *Pseudomonas* تلقی می‌گردد (Yaish, 2006). در میان پاتووارهای *Ps*، پاتووار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) منحصربه‌فرد است زیرا دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و توانایی ایجاد بیماری در بیش از 180 گونه گیاهی را داراست. گیاهانی مانند درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار، مرکبات، کیوی، گندم، ذرت، نیشکر، لوبیا و فلفل از جمله مهم‌ترین میزبان‌های این بیمارگر می‌باشند (Jones, 1971; Sellam and Wilcoxson, 1976; Wise, 1977; Fahy and Persly, 1983; Canfield et al., 1986; Ghabakhloo et al., 1988; Whitesides and Spotts, 1991; Buonauro and Scortichini, 1994; Mazarei and Mostofipour, 1994; Hirano et al., 1995; Rahimian, 1995; Spotts and Cervantes, 1995; Saunier et al., 1996; Balestra and Varvaro, 1997; Shams-Bakhsh and Rahimian 1997; Ashoorpour et al., 2008). احتمالاً دامنه میزبانی وسیع این باکتری، بازتابی از تنوع ژنتیکی آن می‌باشد (Weingart and Volksh, 1997). بررسی ژنتیکی پاتووارهایی با دامنه میزبانی محدودتر نشان داده که آنها یا هیچ تنوع ژنتیکی ندارند و یا تنوع اندکی دارند. به عنوان مثال *P. syringae* pv. *tomato* و *P. syringae* pv. *glycinae*، *syringae* pv. *morspronorum* دارند، تنوع ژنتیکی کمتری دارند (Louws et al., 1999).

در چند دهه اخیر، تلاش‌هایی صورت گرفته تا با استفاده از آنالیزهای مولکولی، تنوع ژنومی موجود میان سویه‌های مختلف باکتریایی بررسی شود و به این وسیله تمایز و طبقه‌بندی آنها در سطوح زیرگونه امکان‌پذیر گردد. از میان این روش‌ها می‌توان به روش rep-PCR (repetitive sequence based-PCR) اشاره نمود که به میزان زیاد، به منظور مقایسه سویه‌ها در حد پاتووار و یا پایین‌تر از آن مورد استفاده واقع شده است (Versalovic et al., 1998; Rademaker and Bruijen, 1998; Weingart and Volksh, 1997; Louws et al., 1995). یکی از مهم‌ترین مزایای روش rep-PCR آن است که برای تعداد زیادی از باکتری‌های گرم منفی و برخی باکتری‌های گرم مثبت قابل اجراء است، بدون آن‌که هیچگونه اطلاعی از ژنوم باکتری در دسترس باشد (Rademaker and Bruijen, 1998). بررسی‌های مختلف مشخص نموده که روش فوق می‌تواند به‌عنوان یک روش مطلوب و قابل اعتماد در بررسی تنوع درون جمعیت پاتووارها مورد استفاده قرار گیرد (Louws et al., 1995).

در ایران بررسی‌های فراوانی روی باکتری *Pss* از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی انجام شده اما تلاش اندکی برای بررسی تنوع ژنوتیپی احتمالی این باکتری انجام شده است. در سال 1388 موسیوند و همکاران (Mosivand et al., 2009) نشان دادند که بر اساس انگشت‌نگاری ژنتیکی حاصل از rep-PCR تنوع زیادی در میان سویه‌های *Pss* دیده می‌شود و می‌توان سویه‌های *Pss* عامل نوار قرمز نیشکر را از سویه‌های *Pss* مولد شانکر در هسته‌داران، بلایت باکتریایی گندم و لکه زاویه‌ای ختمی متمایز نموده و در گروه جداگانه‌ای قرار داد. علاوه بر این نجفی پور و تقوی (Najafi Pour and Taghavi, 2011) نشان دادند که با استفاده از آغازگر BOX می‌توان در میان سویه‌های غلات، هسته داران و دانه داران ترجیح نسبی میزبانی مشاهده نمود؛ به گونه‌ای که جدایه‌های هریک از این سه گروه میزبانی، در یک کلاستر مجزا قرار گرفتند.

در پژوهش حاضر خصوصیات ژنوتیپی سویه‌های *Pss* جداسازی شده از هسته‌داران، غلات، دانه‌داران، برخی

علف‌های هرز و گیاهان زیتنی در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و اصفهان با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP در روش rep-PCR با یکدیگر مقایسه شد. پس از آن با استفاده از نتایج BOX-PCR متعلق به مطالعات پیشین، (Najafi Pour and Taghavi, 2011)، آنالیز خوشه‌ای داده‌های مربوط به هر سه آغازگر مورد استفاده در rep-PCR انجام شد. علاوه بر این از میان سه آغازگر مذکور مناسب‌ترین آغازگر برای تفکیک سویه‌ها مشخص شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی. در این پژوهش، تعداد 58 سویه ی *Pss* موجود در بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که از گیاهان مختلف جداسازی و تعیین خصوصیت شده بود، مورد استفاده قرار گرفت (Najafi Pour and Taghavi, 2011). علاوه بر این جدایه‌هایی از گونه‌های *P. viridiflava* و *P. fluorescens*، *P. meliae* موجود در بخش گیاهپزشکی دانشگاه شیراز، نیز جهت مقایسه استفاده شد. سویه‌های استاندارد *Pss* Instituto Valenciano de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* IVIA2558-IT و IVIA 773-1 اسپانیا مورد استفاده قرار گرفت (جدول 1).

جدول 1- مشخصات سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش

Location	محل جداسازی	host	نام میزبان	strain number
Fars	فارس	Almond	بادام	1
Fars	فارس	Barley	جو	2
Fars	فارس	Rice	برنج	3
Kohgiloye-va-Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Oat	یولاف	4
Fars	فارس	Peach	هلو	5
Fars	فارس	Rose	رز	6
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	7
Chahar Mahal- o Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Healthy peach	هلوی سالم	8
Isfahan	اصفهان	Peach	هلو	9
Kohgiloye-va-Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Almond	بادام	10
Fars	فارس	Rose	رز	11
Kohgiloye-va-Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Apricot	زردآلو	12

Location	محل جداسازی	host	نام میزبان	strain number
Fars	فارس	Peach	هلو	14
Chahar Mahal- o Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Cherry	گیلاس	15
Fars	فارس	Beet	چغندر قند	16
Fars	فارس	Apricot	زردآلو	17
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	18
Chahar Mahal- o Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Peach	هلو	19
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	20
Chahar Mahal- o Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Peach	هلو	21
Fars	فارس	Geranium	شمعدانی	22
Fars	فارس	Pear	گلابی	23
Isfahan	اصفهان	Peach	هلو	24
Fars	فارس	<i>Malva sp.</i>	پنیرک	25
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	26
Isfahan	اصفهان	Peach	هلو	27
Kohgiloye-va- Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Almond	بادام	28
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Wheat	گندم	29
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	30
Kohgiloye-va- Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Almond	بادام	31
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Peach	هلو	32
Isfahan	اصفهان	Peach	هلو	33
Kohgiloye-va- Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Almond	بادام	34
Fars	فارس	Peach	هلو	35
Fars	فارس	Quince	به	36
Chahar Mahal- o -	چهارمحال و	Peach	هلو	37

Location	محل جداسازی	host	نام میزبان	strain number
Bakhtiari	بختیاری			
Isfahan	اصفهان	Peach	هلو	38
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	39
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Cherry	گیلاس	40
Fars	فارس	Peach	هلو	41
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Wheat	گندم	42
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	43
Kohgiloye-va- Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Almond	بادام	44
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	45
Kohgiloye-va- Boyer Ahmad	کهگیلویه و بویراحمد	Apricot	زردآلو	46
Fars	فارس	Almond	بادام	47
Fars	فارس	Geranium	شمعدانی	48
Fars	فارس	Pear	گلابی	49
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Almond	بادام	50
Fars	فارس	Apricot	زردآلو	51
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	52
Chahar Mahal- o - Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Cherry	گیلاس	53
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	54
Fars	فارس	Wheat	گندم	55
Spain	اسپانیا	-----	-----	56
Fars	فارس	Wild almond	بادام وحشی	57
Fars	فارس	Cherry	گیلاس	58
Isfahan	اصفهان	Almond	بادام	59
Fars	فارس	Millet	ارزن	60
			<i>P.savastanoi</i>	IVIA2558-IT
Spain	اسپانیا	-----	-----	13

Location	محل جداسازی	host	نام میزبان	strain number
				<i>P. meliae</i>
Fars	فارس	Chinaberry	زیتون تلخ	61
				<i>P. fluorescens</i>
Fars	فارس	Almond	بادام	62
				<i>P. viridiflava</i>
Fars	فارس	Basil	ریحان	63

تهیه DNA الگو

سوسپانسیونی از باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml ($OD_{600}=1$) تهیه شد و به مدت ده دقیقه جوشانده و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت 5 دقیقه در دور 11000 g سانتریفیوژ شده و از فاز رویی مستقیماً در PCR استفاده شد (Yaish, 2006).

آزمون rep-PCR

برای بررسی تنوع ژنتیکی *Pss* از روش rep-PCR استفاده شد (Versalovic et al., 1991). براین اساس از آغازگرهای ERIC1R، ERIC2، REP1R و REP2I استفاده گردید (Schaad et al., 2001).

آغازگر	توالی
ERIC 1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'
ERIC 2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
REP 1R	5'-IIICGICGICATCIGGC-3'
REP 2I	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

مواد تشکیل دهنده واکنش در حجم نهایی 26 میکرولیتر شامل غلظت 1X بافر PCR، 1/6 میلی مولار $MgCl_2$ ، 45pmol از هر یک از آغازگرها، 0/2 میلی مولار مخلوط dNTPs، 2U آنزیم Taq DNA polymerase و 2 μ L از سوسپانسیون جوشانده باکتری انجام شد. چرخه دمایی با واسرشته سازی اولیه در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 2 دقیقه آغاز و سپس 35 چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 ثانیه و 92 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 52 درجه سانتیگراد برای آغازگرهای ERIC 1R و ERIC 2 و 44 درجه سانتیگراد برای آغازگرهای REP1R و REP2I به مدت 1 دقیقه و امتداد در دمای 65 درجه سانتیگراد به مدت 8 دقیقه و در انتها یک سیکل امتداد نهایی در دمای 65 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه انجام شد (Versalovic et al., 1991).

به منظور بررسی قطعات تکثیر شده در آزمون rep-PCR ژل آگارز 1/5 درصد تهیه و به آن اتیدیوم بروماید به میزان 0/5 میکروگرم به ازای هر میلی لیتر اضافه شد و محصولات PCR به همراه مارکر مولکولی 100 جفت بازی DNA (تهیه شده از شرکت سیناژن) در چاهک های آن بارگذاری و به مدت 3 ساعت در ولتاژ 70 الکتروفورز شد. سپس با استفاده از دستگاه Gel Documentation از ژل عکسبرداری شد. سپس وزن مولکولی قطعات تکثیر شده

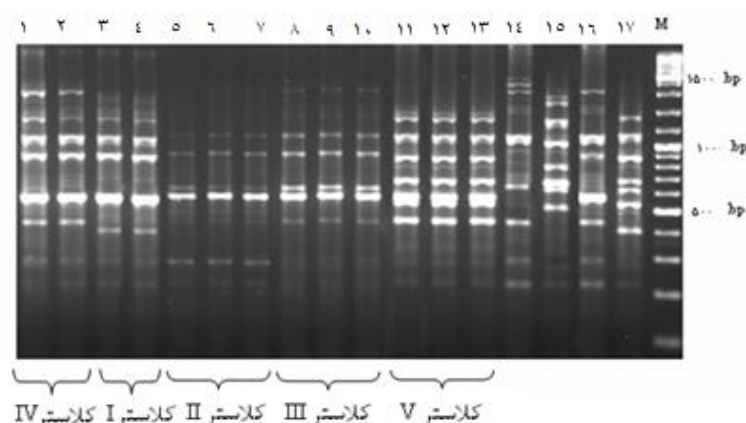
اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌های ژنوتیپی. ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Total lab v1.10 باندهای تشکیل شده در ژل شناسایی و سپس با به‌کارگیری نرم‌افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTsys-pc Version 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم گردید (Rohlf, 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای ملکولی، به صورت وجود و یا عدم وجود نوار در ژل تعیین شد. آنالیز خوشه‌ای براساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) و ضریب تشابه Simple Matching (SM) استفاده گردید (Rohlf, 2000). سپس با استفاده از داده‌های به دست آمده در پژوهش‌های پیشین (Najafi Pour and Taghavi, 2011)، داده‌های مربوط به آغازگرهای ERIC، BOX و REP-PCR با یکدیگر تلفیق و آنالیز خوشه‌ای آنها انجام پذیرفت.

نتایج

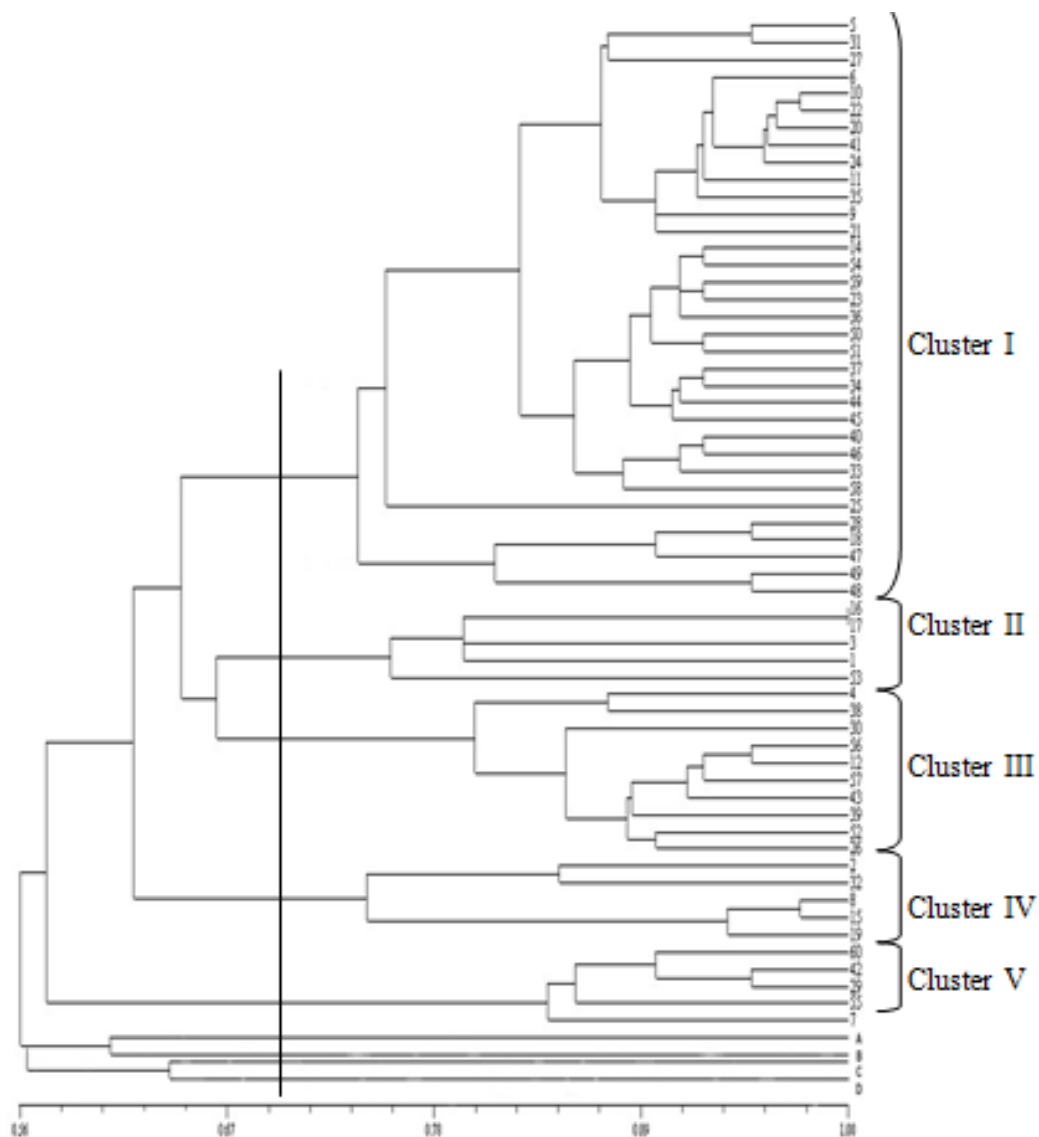
نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات بین نواحی حفاظت شده، با آغازگرهای REP و ERIC برای بررسی تنوع در میان پنجاه و هشت جدایه *Pss* مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای مذکور، قطعاتی با وزن مولکولی 250bp تا 1500 bp تکثیر شد.

در دندروگرام مربوط به آنالیز داده‌های حاصل از آغازگر ERIC سویه‌ها به پنج گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل اغلب سویه‌های هسته داران و دانه داران، بعلاوه دو سویه رز (6 و 11)، دو سویه شمعدانی (22 و 48) و یک سویه پنیرک (25) بود. گروه دوم شامل سویه برنج (3)، سویه چغندر قند (16) و سه سویه از هسته داران (1، 17 و 53) بود. گروه سوم در برگ‌برنده سویه‌های بادام کوهی، سویه یولاف، سویه استاندارد 1-773 (IVIA) و دو سویه از هسته داران (38 و 12) بود. در گروه چهارم سویه جو (2) و چهار سویه از درختان هسته‌دار (8، 15، 32 و 19) قرار گرفت. گروه پنجم شامل سایر سویه‌های غلات به‌علاوه یک سویه از هسته داران (7) بود. سایر گونه‌ها شامل *P. savastanoi*، *P. meliae*، *P. fluorescens*، *viridiflava* و (2).

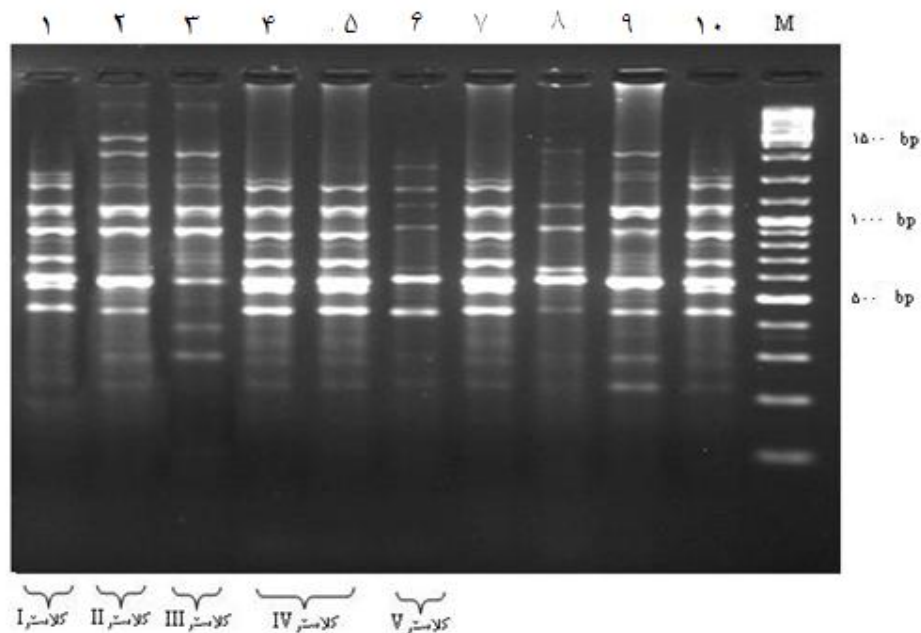


شکل 1- نقش الکتروفورزی محصول PCR سویه های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با استفاده از آغازگر ERIC- ترتیب بارگذاری نمونه ها در چاهکها به صورت زیر است 1: سویه هلو (8) ، 2: سویه گیلاس (15) ، 3: سویه گیلاس (40) ، 4: سویه بادام (28) ، 5: سویه چغندر قند (16) ، 6: سویه بادام (1) ، 7: سویه برنج (3) ، 8: سویه بادام وحشی (30) ، 9: سویه بادام وحشی (43) ، 10: سویه بادام وحشی (52) ، 11: سویه گندم (55) ، 12: سویه گندم (29) ، 13: سویه ارزن (60) ، 14: *P. meliae*: 15 *P. fluorescens*: 16 *P. viridiflava*: 17 (*P. savastanoi* (IVIA2558-IT)) :M مارکر 100 جفت بازی. اعداد داخل پرانتز شماره هر جدایه را نشان می دهد.

در دندروگرام مربوط به آنالیز داده های حاصل از آغازگر REP نیز سویه ها به پنج گروه تقسیم شدند: گروه یک شامل چهار سویه هسته دار اصفهان (9، 24، 27، 33)، یک سویه هسته دار چهارمحال و بختیاری (8)، سه سویه هسته دار فارس (1، 35، 58)، دو سویه هسته دار از استان کهگیلویه و بویراحمد (34 و 28) به علاوه یک سویه غلات (3) بود. گروه دو شامل تعداد زیادی از سویه های هسته داران، سویه های بادام وحشی (3، 26، 39، 57، 52) ، دو سویه رز (6 و 11)، دو سویه شمعدانی (22 و 48) و یک سویه پنیرک (25) بود. گروه سه شامل اغلب سویه های غلات (2، 4، 29، 55، 42) و چهار سویه از هسته داران (5، 18، 31، 51) بود. گروه چهار شامل سویه دانه داران (23، 36 و 49)، چهار سویه از هسته داران (10، 17، 41، 37) و نیز سویه استاندارد (*Pss* IVIA 773-1) بود. گروه پنج شامل یک سویه غلات (60)، یک سویه چغندر قند (16) و سه سویه هسته دار (7، 21 و 32) بود. سایر گونه ها شامل *P. viridiflava*، *P. fluorescens*، *P. meliae* و *P. savastanoi* هر یک در گروهی جداگانه قرار گرفتند (شکل های 3 و 4).



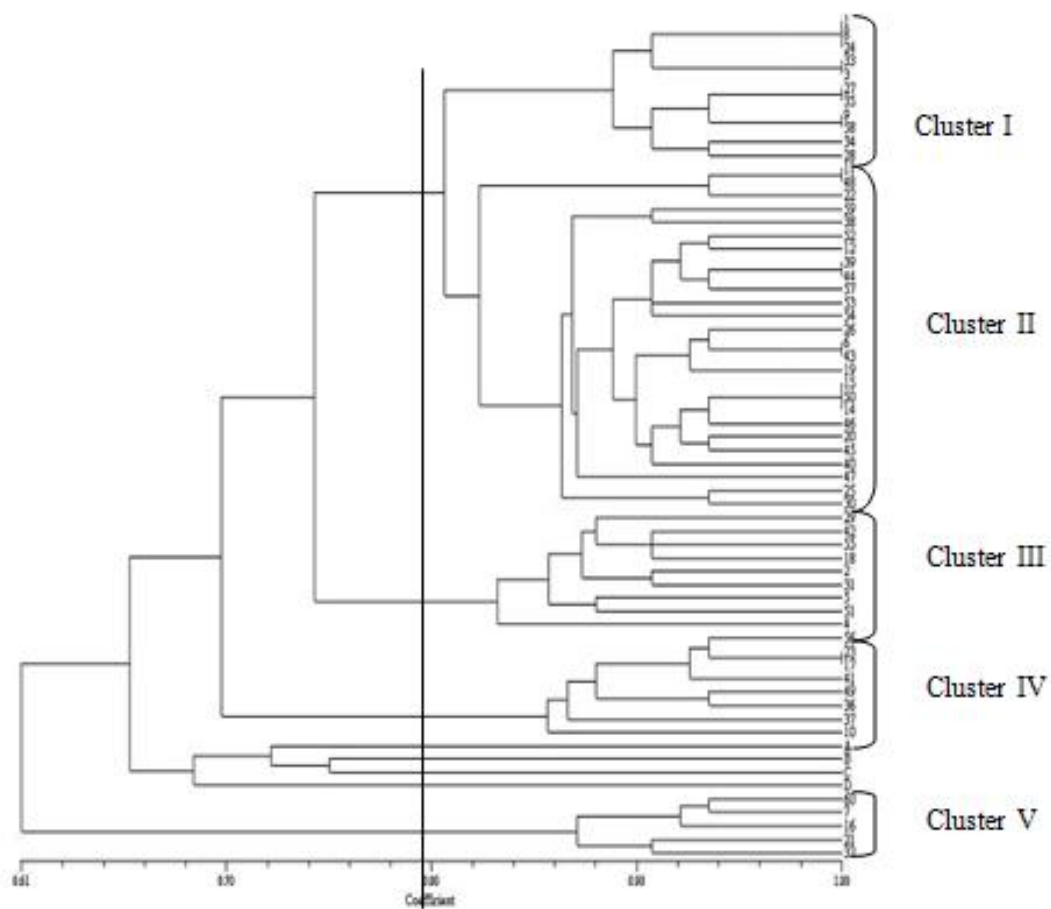
شکل 2. دندروگرام نشان دهنده گروه بندی سویه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از میزبان های مختلف براساس آغازگر ERIC در آنالیز rep-PCR- گروه بندی با روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NT-SYS انجام گرفت (مشخصات جداییه‌ها در جدول یک آمده است). خط عمودی ترسیمی، محل برش دندروگرام را نشان می دهد. این خط بر اساس ایجاد گروه‌هایی با بیشترین تشابه با یکدیگر ترسیم شده است.



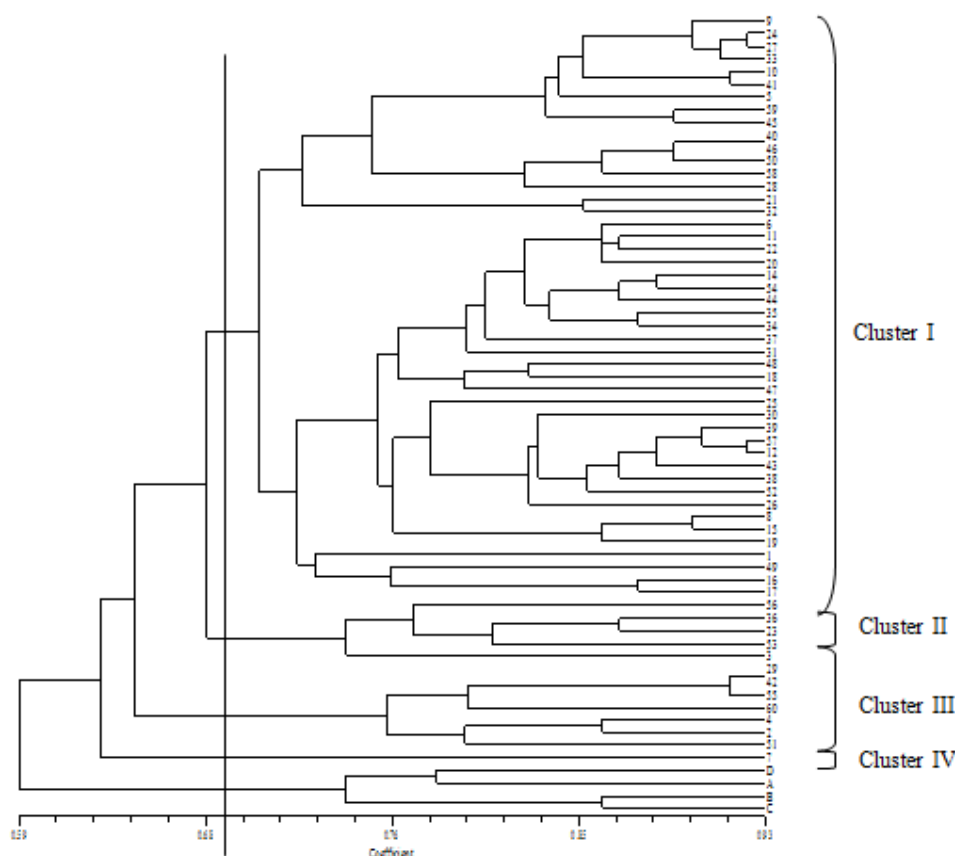
شکل 3. نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با استفاده از آغازگر REP. ترتیب بارگذاری نمونه‌ها در چاهکها به صورت زیر است. 1: سویه هلو (27)، 2: سویه گیلاس (53)، 3: سویه گیلاس (18)، 4: سویه هلو (37)، 5: سویه هلو (41)، 6: سویه ارزن (60)، 7: *P. meliae*، 8: *P. viridiflava*، 9: *P. fluorescens*، 10: *P. savastanoi* (IVIA2558-IT). M: مارکر 100 جفت بازی. اعداد داخل پرانتز شماره هر جدایه را نشان می‌دهد.

سویه‌ها بر اساس نتایج حاصل از ترکیب آغازگرهای BOX، ERIC و REP به طور مشخص به چهارگروه تقسیم شدند (شکل 5).

در گروه اول اغلب سویه‌های هسته‌داران، رز، شمعدانی، چغندر، بادام کوهی، یک سویه گلابی (49) و سویه پنیرک قرار گرفتند. گروه دوم شامل سویه به (36)، گلابی (23)، یک سویه هسته‌دار (53)، یک سویه برنج بعلاوه سویه استاندارد *Pss 773-1* IVIA بود. گروه سوم شامل سویه‌های گندم (29، 42 و 55)، سویه ارزن (60)، سویه یولاف (4)، سویه جو (3) و یک سویه از هسته‌داران (51) بود. در گروه چهارم تنها یک سویه از هسته‌داران (7) قرار گرفت. سایر گونه‌ها شامل *P. savastanoi*، *P. meliae*، *P. viridiflava* و *P. fluorescens* هر یک در گروهی جداگانه قرار گرفتند (شکل 5).



شکل 4. دندروگرام نشان دهنده گروه بندی سویه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از میزبان های مختلف براساس آنالیز REP-PCR درصد تشابه با استفاده از ضریب SM محاسبه شد و گروه بندی با روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NT-SYS انجام گرفت (مشخصات جدایه ها در جدول یک آمده است). خط عمودی ترسیمی، محل برش دندروگرام را نشان می دهد. این خط بر اساس ایجاد گروه هایی با بیشترین تشابه با یکدیگر ترسیم شده است.



شکل 5. دندروگرام نشان دهنده گروه بندی سویه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از میزبان های مختلف براساس تلفیق داده های حاصل از هر سه آغازگر REP، ERIC و BOX در آنالیز rep-PCR - گروه بندی با روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NT-SYS انجام گرفت (مشخصات جدایه ها در جدول یک آمده است). خط عمودی ترسیمی، محل برش دندروگرام را نشان می دهد. این خط بر اساس ایجاد گروه هایی با بیشترین تشابه با یکدیگر ترسیم شده است.

بحث

در این پژوهش پنجاه و هشت جدایه *Pss* با استفاده از آغازگرهای ERIC و REP در آزمون rep-PCR، مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون rep-PCR، با استفاده از آغازگر ERIC سویه ها به پنج گروه تقسیم شدند (شکل های 3 و 4). نکته ای که به طور مشخص در دندروگرام حاصله مشاهده گردید، پراکندگی سویه های هسته داران در گروه های پنج گانه بود. علاوه بر این سویه های غلات نیز در چهار گروه از مجموع پنج گروه پراکنده بودند. همچنین سویه های دانه داران نیز در گروه یک در کنار تعدادی از سویه های هسته داران قرار گرفت. سویه استاندارد و بادام کوهی نیز در گروه سه واقع شدند. این نتایج نشان می دهد که با استفاده از آغازگر ERIC نمی توان سویه ها را بر اساس میزبان از یکدیگر تفکیک نمود، در نتیجه مزیت میزبانی با آغازگر مزبور قابل مشاهده نمی باشد. از طرف دیگر لیتل و همکاران (Little et al., 1998) با استفاده از آغازگر ERIC نشان دادند که سویه های جدا شده از هسته داران

کالیفرنیا، گروه مجزایی از اغلب سویه‌های *Pss* جدا شده از سایر میزبانان ایجاد می‌کند و بنابراین احتمالاً نوعی تخصص میزبانی در پاتووار *Pss* وجود دارد. به نظر می‌رسد یکنواختی ژنتیکی موجود در میان هسته‌داران کالیفرنیا به دلیل سازگاری ژنتیکی سویه‌های *Pss* موجود در منطقه و طی سالیان اخیر به وجود آمده است. ظاهراً کشت طولانی مدت هسته‌داران در یک منطقه اکولوژیکی خاص و عدم ورود ژنوتیپ‌های جدید موجب بروز این وضعیت در هسته‌داران کالیفرنیا گردیده است. این در حالی است که سویه‌های هسته‌داران در ایران احتمالاً از مکان‌های مختلف منشأ گرفته‌اند و مدت زیادی از ورود و کشت آنها در هر منطقه نگذشته است و در نتیجه با استفاده از آغازگر ERIC این تنوع مکانی در منشأ سویه‌ها قابل مشاهده است.

در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر REP نیز سویه‌ها به پنج گروه تقسیم شدند. در این گروه‌بندی نیز سویه‌های درختان میوه هسته‌دار در گروه‌های مختلفی پراکنده بودند؛ اما با این همه بسیاری از آنها به همراه سویه‌های رز، شمع‌دانی و پنیرک در گروه دوم قرار گرفتند. اغلب سویه‌های غلات نیز در گروه سوم و سویه‌های درختان میوه دانه‌دار در گروه چهارم واقع شدند. این نتایج تا حدودی تأییدی بر وجود مزیت میزبانی در میان سویه‌های *Pss* می‌باشد. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط نجفی پور و تقوی (Najafi pour and Taghavi, 2011) مطابقت دارد. آنها با استفاده از آغازگر BOX نشان دادند که می‌توان بر این اساس سویه‌ها را به سه گروه متمایز که با دامنه میزبانی مطابقت نسبی دارد تقسیم نمود. در صورت استفاده از روش سه گانه rep-PCR و آنالیز خوشه‌ای آنها با یکدیگر سویه‌های *Pss* به چهار گروه تقسیم می‌شوند (شکل 5). گروه اول شامل اغلب سویه‌های هسته‌داران، گروه دوم شامل سویه‌های دانه‌داران به همراه سویه استاندارد و یک سویه برنج و یک سویه از هسته‌داران بود. در گروه سوم نیز به‌طور عمده سویه‌های غلات قرار گرفتند. یک سویه از هسته‌داران (7) نیز در گروهی جداگانه قرار گرفت. به نظر می‌رسد آنالیز خوشه‌ای این سه روش با یکدیگر توانایی بیشتری در نمایش ترجیح میزبانی نسبی در میان سویه‌های مختلف *Pss* دارا می‌باشد. تحقیقات لووس و همکاران (Louws et al., 1995) نیز روی تعدادی از گونه‌ها و پاتووارهای جنس *Xanthomonas* نشان داد که در صورت استفاده از روش سه گانه rep-PCR و آنالیز خوشه‌ای آنها با یکدیگر می‌توان این سویه‌ها را طبقه‌بندی نمود، به گونه‌ای که نتیجه حاصله با گروه‌بندی حاصل از هیبریداسیون DNA به طور کامل منطبق است. همچنین سوزوکی و همکاران (Suzuki et al., 2003) با استفاده از سه آغازگر BOX, REP و ERIC تنوع ژنتیکی میان سویه‌های *P. syringae* pv. *pisi* را مشخص کردند. هالووی و همکاران (Halloway et al., 1997) با استفاده از روش rep-PCR سویه‌های استرالیایی *P. syringae* pv. *pisi* را از سایرین تفکیک کردند. مارکوس و همکاران (Marques et al., 2008) نیز با استفاده از آغازگر BOX نشان دادند که می‌توان به این وسیله، نه گروه ژنومی پیشنهاد شده توسط گاردان و همکاران (Gardan et al., 1999) را از یکدیگر تشخیص داد. همچنین با استفاده از این روش، برخی گونه‌های دیگر جنس *Pseudomonas* نیز از *P. syringae* تفکیک شد. نتایج بررسی‌های سیرویلری و همکاران (Cirvilleri et al., 2005) نشان داد که بر اساس انگشت‌نگاری ژنتیکی حاصل از ERIC سویه‌های *Pss* غلات، مرکبات، حبوبات و گندم در هفت گروه ژنتیکی قرار می‌گیرند. موسیوند و همکاران (Mosivand et al., 2009) نشان دادند که براساس انگشت‌نگاری ژنتیکی حاصل از rep-PCR تنوع زیادی در میان سویه‌های *Pss* دیده می‌شود و می‌توان سویه‌های *Pss* عامل نوار قرمز نیشکر را از

سویه های *Pss* مولد شانکر در هسته‌داران، بلایت باکتریایی گندم و لکه‌زاویه ای ختمی متمایز نموده و در گروه جداگانه ای قرار داد (Mosivand *et al.*, 2009). یافته‌های این پژوهش و تحقیقات مشابه نشان می دهد که احتمالاً مزیت میزبانی نسبی در میان سویه های *Pss* وجود دارد (Louws Marques *et al.*, 2008; Mosivand *et al.*, 2009). استفاده از روش rep-PCR با استفاده از آغازگرهای سه گانه BOX، ERIC و REP در این پژوهش نشان داد که روش مذکور، ابزار مولکولی مفیدی به منظور تمایز نسبی سویه های مختلف *Pss* می‌باشد. این نتیجه با نتایج سایر پژوهندگان نیز مطابقت دارد (Versalovic *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2008; Louws *et al.*, 1995; Little *et al.*, 1998). یافته‌های این پژوهش نشان داد که آنالیز ترکیبی آغازگرهای سه گانه در آزمون rep-PCR قادر است به نحو مطلوبی سویه های میزبان های مختلف را از یکدیگر جدا کرده و تا حدودی ترجیح میزبانی این سویه ها را نشان دهد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش پیشنهاد می گردد تحقیقات آینده در جهت استفاده از آغازگرهای تصادفی در آزمون RAPD و همچنین RFLP انجام پذیرد تا مشخص گردد که آیا این ترجیح نسبی میزبانی با آغازگرهای نامبرده نیز قابل تایید است یا خیر.

References

1. Ashorpour M, Niknejad Kazempour M and Ramezanie M. 2008. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of bacterial canker on olives (*Olea europaea*) in Iran. *Science Asia* 34: 323–326.
2. Balestra GM and Varvaro L. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* in Italy. *Phytopathology* 145: 375–378.
3. Buonauro R and Scortichini M. 1994. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pepper seedlings in Italy. *Plant Pathology* 43: 216–219.
4. Canfield ML, Baca S and Moore LW. 1986. Isolation of *Pseudomonas syringae* from 40 cultivars of diseased woody plants with tip dieback in Pacific Northwest nurseries. *Plant Disease* 70: 647–650.
5. Cirvilleri G, Bonaccorsi A, Scuderi G and Scortichini M. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *Phytopathology* 153: 633–750.
6. Fahy PC and Persly GJ. 1983. *Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide*. New York: Academic Press. 389 p.
7. Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F and Grimont PAD. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 469–478.
8. Ghabakhloo A, Shahryari D and Rahimian H. 1998. Tomato syringae spot outbreak in Varamin. Paper presented at: 13th Plant Protection Congress; 23-27 August; Karaj, Iran.
9. Halloway GJ, Gilling MR and Fahy PC. 1997. Use fatty acid profiles and REP-PCR to assess the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* isolated from Australia. *Australian Plant Pathology* 26: 98–108.
10. Hirano SS, Rouse DI, Clayton MK and Upper CD. 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: A study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. *Plant Disease* 79: 1085–1093.
11. Jones AL. 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter* 55: 961–965.
12. Little EL, Bostock RM and Kirkpatrick BC. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3818–3823.
13. Louws FJ, Fulbright DW, Stephenes CT and de Bruijn FJ. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528–536.
14. Louws FJ, Rademaker JL and de Bruijn FJ. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection and diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37: 81–125.
15. Marques ASA, Marchaisson A, Gardan L and Samson S. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *Genetic and Molecular Biology* 31: 106–115.
16. Mazarei M and Mostofipour P. 1994. First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology* 43: 1055–1056.
17. Mosivand M, Rahimian H and Shams-Bakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruit and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45: 75–85.

18. Najafi Pour G and Taghavi SM. 2011. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. *Journal of Agriculture and Science Technology* 13: 431–442.
19. Rademaker JLW and De Bruijn FJ. 1998. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. pp 1–26 *In* ADL Akkermans, JD Van Elsas and FJ de Bruijn (eds). *Molecular Microbial Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
20. Rahimian H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. *Journal of Phytopathology* 143: 321–324.
21. Rohlf FJ. 2000. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter software. New York: Applied Biostatistics INC.
22. Saunier M, Malandrin L and Samson R. 1996. Distribution of *Pseudomonas syringae* pathovars in 23 O-serogroups. *Applied Environmental Microbiology* 62: 2360–2374.
23. Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edition. St. Paul: APS Press. 373 p.
24. Sellam MA and Wilcoxson D. 1976. Bacterial leaf blight of wheat in Minnesota. *Plant Disease Reporter* 50: 242–245.
25. Shams-Bakhsh M and Rahimian H. 1997. Comparative study of citrus blast agent and bacterial canker of stone fruit agent in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 33: 132–143.
26. Spotts RA and Cervantes LA. 1995. Copper, oxytetracycline and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant Disease* 79: 1132–1135.
27. Suzuki A, Togava M and Ohta K. 2003. Occurrence of white tip of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Plant Disease* 87: 1404–1410.
28. Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.
29. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ and Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology* 5: 25–40.
30. Weingart H and Volksh B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR. *Phytopathology* 145: 339–345.
31. Whitesides SK and Spotts RA. 1991. Induction of pear blossom blast by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology* 40: 118–127.
32. Wise MW. 1977. *Compendium of Wheat Disease*. St. Paul: APS Press. 112 pp.
33. Yaish MWF. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in common bean. *Euphytica* 152: 397–404.

Genotypic comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from different hosts based on rep-PCR in Iran

G. Najafi Pour*¹, S.M. Taghavi²

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*Pss*) is one of the most important pathogens, which infects over than 180 hosts and annually causes significant loss in various plants throughout the world. To investigate the genetic features of the bacterium, 58 isolates from different hosts including pome fruits, grains, stone fruits, some weeds and ornamental plants in Fars, Kohgiluyeh and Boyer Ahmad, Char Mahal-o-Bakhtiari and Isfahan provinces, were selected and evaluated, by ERIC and REP primers. Using these primers, 250-1500 bp DNA fragments were amplified. Analysis of ERIC-PCR fingerprint showed that five clusters exist within *Pss* strains, but any host preferences, were not visible. This result showed that using ERIC-PCR, we cannot differentiate various isolates of *Pss* from different hosts. In REP-PCR analysis *Pss* strains used in this study were divided into the five clusters. Although these isolates were distributed in several clusters, some host specialization could be seen in this heterogenous pathovar. Thus it seems that REP primer is a suitable molecular tool for discrimination of *Pss* strains which are isolated from different hosts. Cluster analysis of rep-PCR demonstrated that this method is reliable for showing host preference within *Pss* strains.

Keywords: ERIC-PCR, host preference, *P. syringae* pv. *syringae*, Rep-PCR.

¹- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²- Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: g_najafipour@jia.ac.ir