بازنگری استرین‌های *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار از نظر تنوع ژنتیکی، بیماریزایی و وجود مقاومت به استرپتومایسین

عباس داوودی [۱*]، ابوالقاسم قاسمی [۲] و مونا اسمعیلی [۳]

۱- دانشجوی دکتری، مربی پژوهش، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی قزوین، قزوین، ایران،*

adavoodi74@yahoo.com

۲- کارشناسی‌ارشد، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

ghasemi@yahoo.com

۳- کارشناسی‌ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران،

khodabandeh243@gmail.com

[*]نویسنده مسئول: عباس داوودی

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

Investigation Erwinia amylovora Strains Causing Fire Blight Disease in Pome Fruit trees in term of Genetics, Pathogenicity and Resistance to Streptomycin

Abbass Davoodi[1*], Abolghasem Ghasemi[2]and Mona Esmaeili[3]

1*- Ph.D student, Research Instructor, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Qazvin, Qazvin, Iran, adavoodi74@yahoo.com

2- MS.c, Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran, ghasemi@yahoo.com

3- MS.c, Department of Plant pathology, Agriculture college, Zanjan University, Zanjan, Iran, mona.esmaeili67@gmail.com

*Corresponding author: Abbass Davoodi

Received: June 2018 Accepted: October 2018

چکیده

بیماری آتشک با عامل *Erwinia amylovora* به عنوان مخرب‌ترین بیماری در خانواده رزاسه است که در بعضی از استان‌ها تولید محصول به و گلابی را غیراقتصادی نموده است. در این تحقیق تنوع فنوتیپی، ژنتیکی، بیماریزایی استرین‌ها و نیز احتمال ورود استرین های مقاوم به استرپتومایسین صورت گرفته است. تعداد ٤٢٢ جدایه از نمونه‌هایی که طی فصل بهار، تابستان و زمستان از مناطق مختلف استان‌های خراسان، سمنان، قزوین، لرستان، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و تهران نمونه‌برداری شد حاصل گردید. میزبان‌های مورد نظر در این بررسی سیب، گلابی، به، زالزالک و رز بودند. استرین‌های جداشده از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و مقایسه الگوی پروتئینی شباهت‌های بسیار بالایی نشان دادند. همچنین طی سایر بررسی‌ها جدایه‌های مختلف جغرافیایی و میزبانی از نظر قدرت و شدت بیماریزایی که در برگ‌های گلابی به صورت شاخه بریده ارزیابی گردید، مشابه بودند. تعیین حساسیت استرین‌ها به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، اکسی تتراسایکلین و ترکیب اکسی کلرور مس بررسی گردید و هیچگونه مقاومتی به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین و مس در آنها مشاهده نشد. براساس خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و مناطق جغرافیایی تعداد ۷۵ استرین برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند که در انگشت نگاری به روش rep-PCR با آغازگرهای ERIC و BOX تمامی جدایه‌ها با جدایه مرجع ATCC 49946 هموژن و یکسان بودند و الگوی مشابهی در ژل آگارز ایجاد نمودند. لذا با توجه به نتایج حاصل در پروفیل پروتئینی جدایه‌های ایرانی با جدایه استاندارد که تفاوتی مشاهده نشد، تغییر ژنتیکی در جدایه‌ها برخلاف آنچیزی که انتظار می‌رفت، دیده نشد و در مدیریت این بیماری، ترکیبات شیمیایی باکتری‌کش موجود کماکان با دغدغه کمتری قابل استفاده می‌باشند و نیز یکنواختی استرین‌ها کمک خواهد نمود که از یک رویه یکسان در تهیه ارقام مقاوم، پیش آگاهی بیماری و مدیریت تلفیقی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آتشک، استرپتومایسین، Rep-PCR ،SDS-PAGE (ERIC,BOX)

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۱، صص ۳۰-۲۱

Abstract

Fireblight that accurred with *Erwinia amylovora* in some provinces in Iran and worldwide has made non-economic production of pear and quinces. In the survey was conducted in 2000, bacterial strains that causative of apple, pear and quince fireblight were identical in term of biochemical and physiological characteristics, pathogenicity and protein pattern. So we decided that examine the genetic diversity of *E.amylovora* by use of rep-PCR methods and check the effect of environmental condition and bactericides on resistance of this pathogen. For perform of this study, samples were collected in different of place and provinces of Iran and then transferred to laboratory. Isolation and phenotypic characteristics of some isolate were studied. Electrophoresis of cell-soluble proteins and pathogenicity of strains was determined and in the last step, genetic diversity was evaluated using by rep-PCR and final electrophoresis was performed. In this research, variation of phenotypic, genetic, pathogenecity of strains and the probability of entering steptomycin resistant strains in Iran were tested. Pathogenic strains of *E. amylovora* (422 isolates) were isolated from diseased pear, quince, apple, crateagus trees and rose shrubs from seven major pome fruit growing provinces in Iran during the surveys. The characteristics of the Iranian isolates and a reffernce strain (ATCC 49946) including colony morphology on nutrient sucrose agar, some biochemical characters, copper, streptomycin and oxytetracyclin sensitivity were determined. The soluble protein patterns of the isolates were also determined using SDS-PAGE. All of the stains were the same in phenotypic characteristics and protein profiles and there was not any difference in disease severity of strains. The same band patterns on agarose gel was detected when the isolates were subjected to rep-PCR fingerprinting using both BOX and ERIC primers. None of the strains tested were resistant to streptomycin, oxytetracyclin and copper. The joint findings were described and compared with those of other authors.

Keywords: Fire blight, (ERIC, BOX) rep-PCR, SDS-PAGE, Streptomycin.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۱، صص ۳۰-۲۱

مقدمه و کلیات

بیماری آتشک با عامل *Erwinia amylovora* مخرب‌ترین بیماری در خانواده رزاسه است و باکتری عامل بیماری آتشک سیب، گلابی و به در سال ۱۹۸۵ از کشور ترکیه گزارش شده است (Van der Zwet Keil, 1979). وجود بیماری در ایران در سال ۱۳۷۰ از برغان کرج از روی درختان گلابی گزارش شده است (ذاکری و شریف‌نبی، ۱۳۷۱). وضعیت بیماری آتشک روی درختان میوه در استان آذربایجان غربی و قزوین طی سال‌های ۱۳۷۱ و ۱۳۷۲ مورد بررسی قرارگرفت (مزارعی و همکاران، ۱۳۷۳). گونه *E. amylovora* توسط لیلیوت و دیکی در سال ۱۹۸٤ توصیف شده است. عامل بیماری آتشک سیب، گلابی و به در تمام دنیا باکتری *E.amylovora* می‌باشد ولی در سال ۱۹۹۹ یک گونه جدید به نام *E. pyrifolia* بعنوان عامل نکروز سرشاخه‌های گلابی آسیایی *Pyrus pyrifolia* از کره جنوبی گزارش شد که توانایی آلوده سازی تمام کولتیوارهای سیب را نداشته و تنها روی تعداد معدودی از کولتیوارهای سیب بیماریزا است (Kim *et al.*, 1999). استرین‌های این گونه با روش RAPD-PCR از همدیگر قابل تفکیک هستند (Momol *et al.*, 1997). تقریباً تمام استرینهای *E. amylovora* حامل پلاسمیدی به نام PEA 29 بوده که تشخیص و ردیابی آنها را توسط روش PCR ممکن می‌نماید. گزارش‌هایی وجود دارد که استرین‌های باکتری عامل بیماری آتشک تخصص میزبانی نداشته و استرین‌های جدا شده از سیب قادرند غیر از گلابی و سیب، درختان جنس *Prunus* را آلوده سازند (Mohan and Thoson, 1996). استرین‌های باکتری عامل بیماری آتشک سیب، گلابی و به جدا شده از ایران از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، بیماریزایی و الگوی پروتئینی یکسان بوده‌اند (افیونیان، ۱۳۷۹). استرین‌های طبیعی این باکتری تعداد کمی از پلاسمید ۲۹ کیلو بازی (pEA29) را حمل می‌کنند که با تکثیر قطعه ۹۰۰ جفت باز حاصل از برش *Pst*I قابل شناسایی است (Bereswill *et al.*, 1992). تنوع در اندازه قطعه برشی در استرین‌های جمع‌آوری شده از اروپا آنها را در سه تیپ طبقه بندی کرده است (Lecomte *et al.*, 1997). در آنالیز RFLP پلاسمید (pEA29) از ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده در بلغارستان با استفاده از آنزیم *Hpa*II، استرین ها به سه گروه ژنتیکی تفکیک شدند (Atanasova *et al.*, 2009). عامل بیماری از نظر ژنتیکی، همسانی بسیار بالایی دارند و روش‌هایی که تا اوایل سال ۲۰۰۷ از نظر DNA کروموزومی مورد بررسی قرارگرفتند مؤید این مسئله می‌باشد. فیلوژنی مدرن بیشتر براساس آنالیز نوکلئوتیدی 16SrRNA می‌باشد (Woese,1987; Stackebrandt and Goebel, 1994). یکی دیگر از روش‌ها تحت عنوان rep-PCR genomic fingerprinting است که روشی معتبر، سریع و دارای قدرت تشخیص و تفکیک بالا است و می‌تواند جدایه ها را در سطح گونه، زیرگونه و استرین شناسایی و تفکیک کند (Versalovic *et al.*, 1991; Louws *et al.*, 1996). در باکتری‌های گرم منفی و مثبت توالی‌های DNA تکراری بطورطبیعی در سرتاسر ژنوم وجود دارند که عناصر پالیندرومیک خارج ژنی تکرار شده Repetitive Extragenic Palindromes یا (Rep) توالی‌های بین ژنی تکرار شده در انتروباکترها (Repetitive intergenic Enterobacterial) Consensus یا (ERIC) و عناصر BOX می‌باشند. عناصر REP بیشتر در رونویسی مناطق انتهایی

mRNA نقش دارند. توالی‌های نوکلئوتیدی تکرار شده دیگر در باکتری‌ها، عناصرERIC می‌باشند که اندازه توالی آن ۱۲٤-۱۲۷ جفت باز می‌باشد. این توالی‌ها فاقد مناطق واسرشتگی هستند و در هیبریداسیون و PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده حتی یکی از این توالی‌ها می‌تواند در شناسایی جدایه‌های باکتری، مفید واقع شود، در اینگونه موارد آغازگر BOX پیشنهاد می‌شود. اندازه توالی باکس ۱٥٤ جفت باز می‌باشد (Louws *et al.*, 1994; De Bruijn, 1992). با استفاده از فناوری PCR بر اساس انگشت‌نگاری rep–PCR، آغازگرهایی استفاده می‌شوند که به انتهای توالی‌های DNA این سه ناحیه تکرار شده هیبرید می‌گردند و تکثیر توالی‌های DNA بین این توالی‌های تکرار شده یک سنجشی از قطعات DNA با اندازه‌های مختلف روی ژل آگارز به دست می‌دهد که نتیجه آن انگشت‌نگاری DNA با اختصاصیت بالا می‌باشد (Robertson *et al*, 2001). الگوی انگشت‌نگاری rep–PCR در شناخت تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر کمک می‌کند، بنابراین تحقیق روی پارامترهای محیطی که در فشار انتخابی روی جمعیت میکروبی مؤثر بوده‌اند را راحتتر می‌کند. این روش برای طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌ها تا سطح استرین کاربرد دارد (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn,1992). توالی‌های REP به عنوان اولین توالی‌های بالقوه در مناطق ایران به واسطه طبیعت پالیندرومیک خود و توانایی تشکیل ساختارهای سنجاق سر طی ترجمه RNA پیشنهاد شدند (Higgins *et al.*, 1982). از توالی ERIC در انگشت‌نگاری نمونه‌هایی که اختلافات جزئی با هم دارند استفاده می‌شود. از آنجایی که ERIC-PCR در مقایسه با بقیه از باندهای فرعی سبک ناسازگار بیشتری برخوردار بوده و آغازگر BOX نیز برای تمایز اختلافات جزئی بین استرین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، REP-PCR به دلیل عدم دارا بودن محدودیت‌های فوق بیشتر قابل استفاده است.

فرآیند پژوهش

نمونه‌برداری: در فصول بهار، تابستان و زمستان از مناطق مختلف استان خراسان، سمنان، قزوین، لرستان، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و تهران بازدید و نمونه‌های برگ، گل، میوه و شاخه‌های درختان سیب، گلابی، به، رز، زالزالک و سایر گیاهان خانواده رزاسه که دارای علائم بیماری شامل سوختگی گل، میوه، برگ، سرشاخه‌ها و شانکر تنه بودند، جمع‌آوری و با ثبت مشخصات به آزمایشگاه در مراکز تحقیقاتی منتقل گردید.

جداسازی باکتری عامل بیماری: نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا شستشو داده شدند، سپس قطعه کوچکی از بافت آلوده در تشتک پتری حاوی آب مقطر با اسکالپل خرد و پس از ده دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک لوپ از آن روی محیط NAS مخطط شد. تشتک‌های پتری دو روز در دمای ۲٤ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس کلنی‌های گرد و برجسته لوان مثبت انتخاب و روی محیط کینگ ب تکثیر شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌ها: بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های خالص بر اساس روش‌های ذیل انجام گردید. واکنش گرم با استفاده از روش حلالیت در KOH سه درصد (Sulsow *et al.*, 1982) آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی (Hugh and Leifson, 1953) آزمون فوق حساسیت در توتون (Klement *et al.*, 1963)، آزمون آرجینین‌دهیدرولاز

(Thorneley, 1960)، آزمون هیدرولیز توئین ۸۰ (Misaghi and Grogan, 1996)، آزمون تولید لسیتیناز (Lelliott, and Stead, 1987)، آزمون اکسیداز، تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کینگ ب، تولید لوان، هیدرولیز ژلاتین، اسکولین و کازئین و نیز آزمون‌های کاتالاز، اوره از، تولید گاز H_2S از سیستئین، تولید ایندول، تولید مواد احیاء کننده از ساکارز، احیای نیترات، تولید اوره آز، رشد در NaCl ۳٪ (وزن به حجم) و آزمون تولید مواد احیا کننده به روش (Schaad *et al.*, 2001) و نیز آزمون MR-VP به روش دی (Dye) انجام گردید (Dye, 1968). منابع کربنی با استفاده از روش تندالیزاسیون سترون شدند و به محیط پایه اضافه شدند و نتایج تا ۱۵ روز به صورت روزانه ارزیابی شد (Fahy and Hayward, 1983). در تمامی مراحل این تحقیق از جدایه مرجع ATCC 49946 جداشده از سیب در رودآیلند ایالات متحده استفاده شد.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی: از کشت ۲٤ ساعت جدایه‌ها روی محیط NA سوسپانسیونی نسبتاً غلیظ در یک میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد و معادل ۲/. حجم آن بافر نمونه اضافه و به مدت ٤ تا ٦ دقیقه درحمام آبی جوشانده شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سا نتریفوژ گردید. میزان ۵۰ میکرو لیتر از هر نمونه پروتئین‌های محلول سلولی به چاهک‌ها در ژل ناپیوسته ۱۰ درصد پلی اکریل آمید با میکروپیت بارگذاری شد و الکتروفورز با جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل انجام گرفت، سپس ژل در محلول رنگ‌آمیزی (آب، متانول، اسید استیک به نسبت ۱۰:۵۰:۵۰ و ۱/. گرم کوماسی بلو G250) روی شیکر به مدت ۵-٤ ساعت قرارگرفت. جهت رنگبری، ژل در محلول مشابه محلول رنگ‌آمیزی ولی بدون کوماسی‌بلو تا زمان وضوح باندها قرارداده شد. سپس از ژل عکس گرفته شده و جهت نگهداری در محلول اسید استیک ۷/. منتقل گردید و در ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تعیین شدت بیماریزایی استرین‌ها: شدت بیماریزایی جدایه‌ها در برگ‌های گلابی به صورت شاخه بریده ارزیابی گردید. سوسپانسیون رقیقی از جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری بدون سر سرنگ در دو سمت پهنک برگ به قطر ۵ میلی‌متر تزریق گردید و پس از ٤ روز قطر ناحیه آلوده اندازه‌گیری گردید (James, 1971).

تعیین حساسیت استرین‌ها به استرپتومایسین: تعیین حساسیت استرین‌ها به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، اکسی تتراسایکلین و ترکیب اکسی کلرور مس با پخش سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^6 سلول در میلی‌لیتر در محیط NAS و با استفاده از دیسک‌هایی که با محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسی کلرور مس (۳۷ درصد) آغشته شده بود، با ایجاد هاله بیش از ۷ میلی‌متر ارزیابی شد (Burr *et al.*, 1988).

تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی و میزبانی *E. amylovora* به روش rep-PCR: جدایه‌های باکتری به مدت ۲٤ ساعت روی محیط NA تکثیر شدند و سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^7 سلول در میلی‌لیتر از هر باکتری در آب مقطر تهیه گردید. از روش لیز قلیایی برای آزادسازی DNA استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر

هیدروکسید پتاسیم ۰/۰۵ مولار مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد قرارگرفت. سوسپانسیون به مدت ۲ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول‌رویی به تیوب‌های تمیز منتقل و جهت استفاده نگهداری گردید (Rademaker *et al.*, 1997).

روش rep-PCR: انگشت‌نگاری ژنتیکی استرین‌ها و یک جدایه استاندارد CCPB0273 با مارکر rep انجام شد. تنوع جدایه‌های مورد نظر با یک جفت آغازگر ERIC (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC- 3') و 1R، (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG- 3') ERIC 2 و آغازگر BOXA1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3') بررسی شد. لازم بذکر است که آغازگرها توسط شرکت سیناژن ساخته شدند.

تهیه مخلوط واکنش و چرخه حرارتی: مقدار کل هر واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر DMSO(٪۱۰۰) ، ۰/۵ میکرولیتر از بازهای سازنده (dNTP)۲۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر Taq پلیمراز (5 U/µL) به عنوان کاتالیز کننده سنتز زنجیره پلی‌نوکلئوتیدی، ۱ میکرولیتر (۲ میکرولیتر برای BOX) از هر آغازگر ۲۰ پیکومول و ۱ میکرولیتر از DNA ی آماده شده بود و در نهایت برای رساندن حجم هر نمونه به ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر سترون استفاده گردید. پس از مخلوط کردن کامل مواد واکنش، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD مدل MJ Research PTC قرار گرفتند. باز شدن دو رشته DNA از یکدیگر (Initial denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و چسبیدن آغازگر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ساخته شدن رشته‌های DNA جدید در دمای ٦۵ درجه به مدت هشت دقیقه از روی الگو طی ۳۵ چرخه و به دنبال آن یک دوره ساخت نهایی در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت (Rademaker *et al.*, 1997).

الکتروفورز نتیجه PCR در ژل و عکس برداری از ژل: محصول PCR با دستگاه الکتروفورز افقی مینی ژل (mini gel) مدل سیگما (Sigma) روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. ابتدا ژل آگارز در بافر TBE (شامل Tris-base 89 pH=8، EDTA 2mM، Boric-acid 89 mM) تهیه و برای رنگ‌آمیزی DNA به آن محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ mg/L اضافه گردید. ماده رنگی پیشرو ٦x (حاوی گلیسرول ٦۰ درصد، EDTA ٦۰ میلی مولار، برومونفنول بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن سیانولFF ۰/۰۹ درصد) به نسبت ۱ به ۳ با محصول PCR مخلوط و در ژل آگارز با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱/۵ ساعت الکتروفورز گردید. برای ارزیابی اندازه قطعات محصول rep-PCR از مارکر استاندارد یک کیلو جفت بازی استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه UV-Doc مشاهده و عکسبرداری شد.

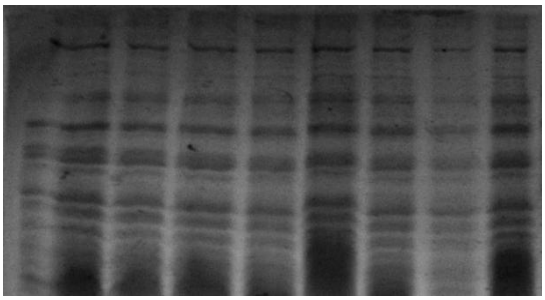
نتایج و بحث

نمونه‌برداری و جداسازی: در مجموع تعداد ٤۲۲ جدایه از استان‌های مختلف (قزوین ۱۲۰، خراسان ۷۱، سمنان ۵۰، لرستان ٤۰، تهران ۲۵، آذربایجان شرقی ۷۰، آذربایجان غربی ۳٦ و سایر مناطق ۱۰) و از میزبان‌های مختلف سیب، گلابی، به، زالزالک و رز جداسازی شده است.

خصوصیات بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها: در آزمون‌های فنوتیپی شباهت بسیار بالایی بین استرین‌ها مشاهده شد. جدایه‌های مورد بررسی گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و لوان مثبت بوده، توانایی ایجاد

واکنش فوق حساسیت در توتون و تولید تراوش باکتریایی در میوه گلابی را داشته‌اند و در محیط کینگ ب رنگیزه فلورسنت تولید ننمودند که به عنوان گونه *E.amylovora* شناسایی شدند. جدایه‌ها اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بوده، در تولید مواد احیا کننده از سوکروز و هیدرولیز ژلاتین و اسکولین مثبت بودند. در آزمون‌های احیاء نیترات، تولید ایندول، دهیدرولیز آرجی نین، لهانیدن سیب زمینی، تولید استوئین، هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیزکازئین و تولید گاز از گلوکز، تولید H_2S از سیستئین، دزوکسی ریبونوکلئاز، اوره آز، و لسیتیناز منفی بودند. جدایه‌ها در استفاده از منابع کربنی گلوکز، گالاکتوز، سوکروز، سلوبیوز، تریهالوز، اینوزینول، فروکتوز، ریبوز، دی مانیتول، دی سوربیتول، گلیسرول، سیترات، لاکتات، فرمات و آل پرولین مثبت و از رامنوز، ملی بیوز، مالتوز، سوربوز، مانوز، دی آرابینوز، آدونیتول، گلیسین، مانوز، آدونیتول، آسکوربات، نشاسته، گلوتامیک اسید، آل (-) تارتارات و گالاکترونیک اسید استفاده ننمودند.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی: استرین‌ها از نظر پروفیل پروتئینی الگوی مشابهی با جدایه استاندارد ATCC 49946 داشته و اختلافی بین استرین‌ها از نظر منشاء جغرافیایی و میزبانی مشاهده نشده است و از این نظر همولوژی بالایی داشتند (شکل ۱).



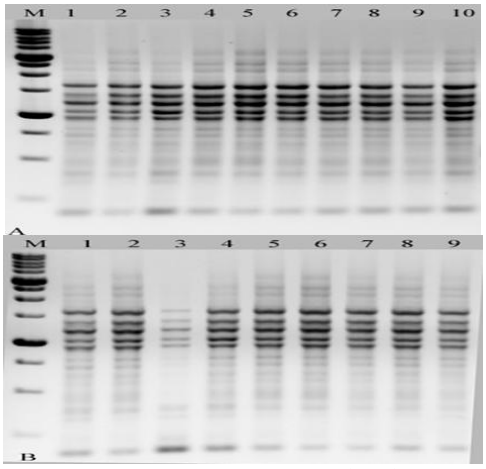
شکل ۱. پروفیل پروتئینی تعدادی از جدایه‌ها در ژل پلی اکریل آمید

Fig1: Protein profile of some isolates in polyacrylamide gel

شدت بیماریزایی: شدت بیماریزایی در تعداد ۷۵ استرین منتخب مورد ارزیابی قرارگرفت که با مقایسه نمونه‌ها در دو تکرار تقریباً تمامی نمونه‌ها پس از ٤ روز هاله‌ای به قطر یک سانتی متر را آلوده نمودند و علائم سوختگی و بلایت را نشان دادند.

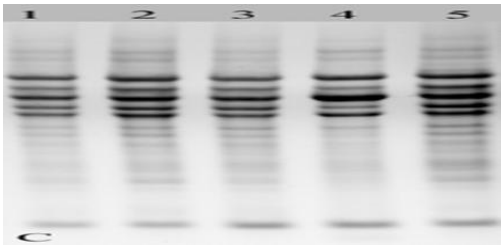
حساسیت به استرپتومایسین: تمامی استرین‌های جدا شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف کشور به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین به میزان ۱۰۰ppm و ۳۰۰ ppm (ماده مؤثر) مس در ترکیب اکسی کلرور مس حساس بودند و هاله‌ای بیش از ۷ میلی‌متر ایجاد نمودند.

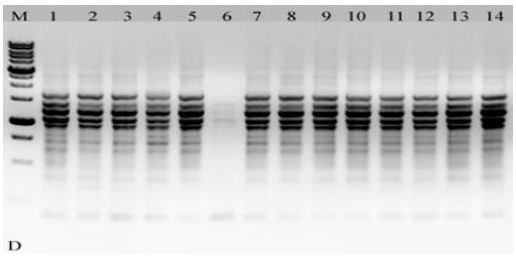
تنوع ژنتیکی استرین‌های عامل بیماری: ۷۵ استرین از استان‌های مختلف با توجه به تنوع میزبانی در انگشت‌نگاری ژنتیکی به، به روش rep-PCR با دو آغازگر ERIC و BOX مورد ارزیابی قرارگرفتند. در این روش تمامی استرین‌ها با هر دو آغازگر تکثیر شده و الگوی مشابهی در ژل آگارز ایجاد نمودند. این نتایج بیانگر هموژنی ژنتیکی بالا در گونه *E. amylovora* در ایران می‌باشد (شکل‌های A, B, C, D ۳ و ٤).



شکل A, B ۲. انگشت‌نگاری استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از قزوین (شماره‌های ۲A-10)، خراسان (2-9B) و جدایه مرجع ATCC 49946 (شماره A, B۱) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC

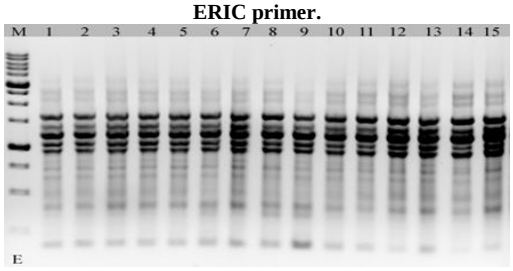
Fig B, A 2: Fingerprints of *E. amylovora* strains, isolated from Ghazvin (numbers 2-10A), Khorasan (2-9B) and reference isolate ATCC 49946 (number 1A,B), using rep-PCR method with ERIC primer.





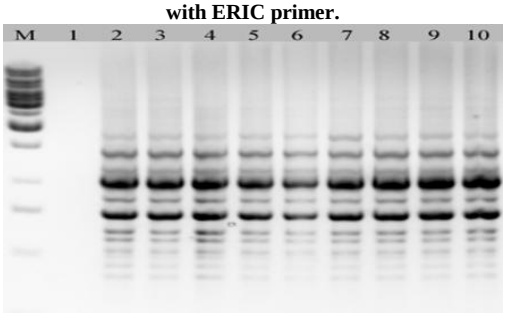
شکل ۳C, D. انگشت‌نگاری استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از لرستان (شکل C)، تهران (2-6D)، سمنان (7-14D) و جدایه مرجع ATCC 49946 (1D) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC

Fig3 C, D: Fingerprint of *E. amylovora* strains, isolated from Lorestan (picture C), Tehran (2-6D), Semnan (14D-7) and reference isolate ATCC 49946 (ID), using rep-PCR with ERIC primer.



شکل E4. انگشت‌نگاری استرین‌های *E. amylovora* آذربایجان شرقی (شماره‌های ۸۲-)، آذربایجان غربی (شماره‌های ۱۵۹-) و جدایه مرجع ATCC 49946 (شماره ۱) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC

Fig4E: Fingerprint of *E. amylovora* strains, isolated from East Azerbijan (numbers 2-8), West Azerbijan (9-15) and reference isolate ATCC 49946 (number 1) using rep-PCR with ERIC primer.



شکل ۵. انگشت‌نگاری یک نماینده از استرین‌های *E. amylovora* استان‌های آذربایجان شرقی (3)، آذربایجان غربی (4)، سمنان (5)، تهران (6)، قزوین (7)، خراسان (8)، لرستان (9)، زنجان (10)، جدایه مرجع ATCC 49946 (2) و کنترل منفی (1) به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX

Fig5: Fingerprinting of a representative of the *E. amylovora* strains in East Azerbaijan (3), West Azerbaijan (4), Semnan (5), Tehran (6), Ghazvin (7), Khorasan (8), Lorestan (9), Zanjan (10), reference isolate ATCC 49946 (2) and negative control (1), using rep-PCR with BOX premier.

بازدید و نمونه‌برداری در استان‌های مختلف نشان داد که عامل بیماری در همه استان‌های اجرای این تحقیق و تعدادی از استان‌های دیگر که در این تحقیق پیش‌بینی نشده بود به شدت فعال بوده که میزان آلودگی در سال‌های مختلف با توجه به گرم و مرطوب بودن فصل بهار تفاوت زیادی دارد. جدایه‌ها از نظر شدت بیماریزایی با توجه به گیاهی که از آن جداسازی شدند تفاوتی در آزمایشات نشان ندادند در حالی که بعضی از جدایه ها از نظر شدت بیماریزایی در واریته‌های خاصی از میزبان با هم اختلاف نشان می‌دهند مانند جدایه E4001A که با جدایه Ea273(ATCC 49946) از نظر شدت بیماریزایی روی ارقام با هم تفاوت دارند (Norelli *et al.*, 1984). همچنین در این تحقیق با بررسی نمونه‌های تمشک از استان لرستان آلودگی و بیووارای که از تمشک با نام *E. amilovora* f. sp. *Rubi* جداسازی شده بود در ایران مشاهده نشده است (Starr *et al.*, 1951). همه استرین‌ها از نظر حساسیت به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین در قیاس با جدایه مرجع مشابه و حساس بودند در صورتی که استرین‌های مقاوم در بسیاری از کشورها از جمله ایالات متحده که بیش از چهار دهه از استرپتومایسین استفاده می‌نمایند و فلسطین اشغالی گزارش شده است (Vannest, 2000). در بروز مقاومت باید دو نکته مورد توجه قرارگیرد یکی ایجاد مقاومت که تحت تأثیر موتاسیون‌های مختلفی در باکتری‌ها ایجاد می‌شود که این مسئله کمتر در اثر کاربرد باکتری کش‌ها می‌باشد و بیشتر به توانایی باکتری‌ها در اکتساب مقاومت از محیط که با روش کنجوگاسیون دوتایی و یا سه والدی اتفاق میفتد هست و دیگری برجسته شدن مقاومت که در ظهور

جدایه‌های مقاوم در بسیاری از موارد انتظار می‌رود، به این معنی که استرین‌های مقاوم در طبیعت موجود بوده ولی در استفاده از باکتری کش‌ها جمعیت حساس کم شده و یا از بین می‌روند و جمعیت مغلوب مقاوم نمایان می‌گردد که انتخاب محیطی نام دارد. از نظر ژنتیکی جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه مرجع با روش rep-PCR مورد مقایسه انگشت‌نگاری DNA قرار گرفتند. در این تحقیق جدایه‌های ایرانی که از تمامی مناطق تولید درختان میوه دانه‌دار و از میزبان‌های اصلی و همچنین غیراقتصادی جمع آوری شده بودند مورد ارزیابی قرارگرفتند. نتایج نشان داد که کمترین تفاوتی بین جدایه‌های ایرانی و نیز جدایه مرجع ATCC 49946 هم در ERIC-PCR و هم در BOX-PCR مشاهده نشد. در یک تحقیق دیگری که با تعداد کمی جدایه که از سال‌های مختلف در ایران جمع آوری شده بود بر اساس روش RAPD-PCR مورد مقایسه قرارگرفتند که تفاوتی در نتایج مشاهده نشده بود (امیدوار و همکاران، ۱۳۸۵).

نتیجه‌گیری کلی

در پروفیل پروتئینی جدایه‌های ایرانی با جدایه استاندارد، تفاوتی مشاهده نشد که با نتایجی که در ایران درسال ۱۳۷۹ توسط افیونیان گزارش شده بود مشابه است که این خود نشانه‌ی ایجاد نشدن مقاومت و عدم تغییر ژنتیکی جدایه‌هاست. بنابراین باتوجه به تعیین تنوع ژنتیکی پاتوژن‌ها که در همه‌گیرشناسی بیماری اهمیت دارد می‌توان گفت که پیش نیاز اساسی در توسعه روش‌های تشخیصی نیز می‌باشد.

منابع

۱) افیونیان، م.، محمدی، م و. ح، رحیمیان. ۱۳۷۹. خصوصیات فنوتیپی استرین‌های ایرانی *Erwinia amylovora* عامل باکتریایی بیماری آتشک سیب، گلابی و به. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۱، شماره ۳، صفحات ٤٦٣-٤٦٧.

۲) امیدوار، ر.، شمس، م و. و، رحیمیان. ۱۳۸۵. توصیف و شناسایی جدایه‌های ایرانی باکتری *E.amylovora* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی. مجله بیماری‌های گیاهی، ٤٢: ٦٧٣-٦٨٦.

۳) ذاکری، ز و. ب، شریف‌نبی. ۱۳۷۰. بیماری آتشک گلابی در کرج. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمان. صفحه ۱۵۷.

٤) مزارعی، م.، ذاکری، ز و. ن، حسن‌زاده. ۱۳۷۳. وضعیت بیماری آتشک روی درختان میوه در استان آذربایجان غربی و قزوین در سال‌های ۱۳۷۱ تا ۱۳۷۲. مجله بیماری‌های گیاهی، شماره ۱-٤ صفحات ۲۵ تا ۳۲.

5) Atanasova, I., Kabadjova, P., Stefanova, K., Bogatzevska, N., Moncheva, P. 2009. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains from Bulgaria by PCR-RFLP analysis. European Journal Plant Pathology, No 124:451-456.

6) Bereswill, S., Pahl, A., Belleman, P., Zeller, W., and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, No 58:3522–3526.

7) Burr, T. J., Norlli, J. L., Katz, B., Wilcox, W. F. and Hoying, S. A. 1988. Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae pv. populans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. Phytopathology, No 78: 410-413.

8) De Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacter repetitive intergenic consensus) sequence and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, No 58: 2180-2187.

9) Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. the amylovora group. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, No 11: 590-607.

10) Fahy, P. C. and Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Fahy, P. C. and

Persley, G. J. (eds). Plant Bacterial Disease, a Diagnostic Guide, 337-378pp.

11) Higgins, C. F., Ames, G. F. L., Barnes, W. M., Clement, J. M. and Hofnung, M. 1982. Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. Nature, No 298: 760-762.
12) Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidadative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. Journal of Applied Bacterioplog, No 66: 22-26.
13) James, w. c. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases. Canadian Plant Disease Survey, No 51: 39-65.
14) Kim, w. s., Gardan, L., Rhim, S. L, and Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus* pyrifolia Nakai). International Journal of Systematic Bacteriology, No 49: 899–906
15) Klement. Z., Farkas, G. L. and Lovrekovich, L. 1963. Hypersensitive Reaction induced by phytopathogenic bacteria in the Tobacco leaf. Phytopathology, No 54: 474-477.
16) Lelliott, R. A. and Stead, D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plant. Black well Scientific Publications Oxford, 216pp.
17) Louws, F. J., Fulbright, D. W., Taylor-Stevens, C. and De Bruijn, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. Applied Environment Microbiolgy, No 60: 2286-2295.
18) Louws, F. J., Schneider, M. and De Bruijn, F. J. 1996. In: Toranzos G, (eds), Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples. Technomic Publishing Company, 63-94pp.
19) Misaghi, I., and Grogan, R. G. 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent Pseudomonas. Phytopathology, No 59:1436-1450.
20) Mohan, S. K. and Thoson, S. V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. Acta Horticulture, No 411: 73-76.
21) Momol, M. T. Momol, E. A. Lamboy, W. F., Noreelli, J. L., Beer, S. V. and Aldwinckle, H. S. 1997. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments. Journal of Applied Microbiology, No 82: 389- 398.
22) Norelli, J. L., Aldwinkle, H. S. and Beer, S. V. 1984. Differential host pathogen interaction among cultivars of apple and stains of *Erwinia amylovora*. Phytopathology, No 74: 136- 139.
23) Rademaker, J. L. W., Louw, F. J., and de Bruijn, F. J. 1997. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep –PCR fingerprinting. Page 1-26 in: Molecular Microbial Ecology Manual Suppl. 3. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn, eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
24) Robertson, A. E., Fortnum, B. A., Wood, T. C., and Klueofel, D. A. 2001. Diversity of Ralstonia solanacearum in the Southeastern United States. Beitrage zur Tabakforschung International, No 19: 323-331.
25) Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W.2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3eds, APS Press, 373pp.
26) Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyan bacterial Mat Communities. International Journal Systematic Bacteriology, No 44:846-849.
27) Starr, M. P. Cardona, C. and Folson, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. Phytopathology, No 41: 915-919.
28) Sulsow, T. V., Schroth, M. N. and Saka, M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic bacteria and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, No 72: 917-018.
29) Thorneley, M. J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology, No 13: 37-52.
30) Van der Zwet, T. 1979. Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants. United States Department of Agriculture

handbook 510. Washington, DC: Government Printing Office.

31) Vannest, J. L. 2000. Fire Blight, The Disease and it`s Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, 370pp.

32) Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., and Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Molecular Cellular Biology, No 5:25-40.

33) Woese, C. R. 1987. A High Proportion of Novel Mycobacteria Species Identified by 16S rDNA Analysis among Slowly Growing AccuProbe-Negative Strains in a Clinical Setting. Microbiological Reviews, No 51:2:221-271.