

سبب شناسی بیماری لکه تاولی و نکروز برگ‌گی خیار و خربزه در استان مازندران Etiology of leaf spot and blistering disease of cucumber and Melon in Mazandaran province

مینوچهر ارسلانی^۱، ابوالقاسم قاسمی^{۲*} و مژده ملکی^۳

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲

پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲

چکیده

خیار و خربزه به ترتیب با سطح زیر کشت ۶۳۰ و ۸۰ هزار هکتار به ترتیب از تولیدات مهم در کشت‌های مزرعه و گلخانه‌های محسوب می‌شود ولی عوامل مهم بیماری‌زا به ویژه باکتری *Pseudomonas syringae* با ایجاد نکروز در قسمت‌های هوایی سبب خسارت به گیاه می‌شود. تاکنون وجود باکتری‌های *P. syringae* pv. *lachrymans* و *P. viridiflava* از کدوییان در ایران گزارش شده است ولی عامل لکه تاولی و نکروز صیفی‌جات از ایران گزارش نشده است، در این تحقیق عامل بیماری لکه تاولی و نکروز برگ‌گی خیار و خربزه روی محیط آگار غذایی با روش شاد و همکاران جداسازی و با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شد. بر اساس نتایج آزمون‌های مولکولی، توالی قطعه به دست آمده از ژن *rpoB* و شباهت ۹۹ درصدی با توالی این ژن در باکتری *P. straminea* با شماره دسترسی FN554758 در پایگاه اطلاعاتی NCBI داشته و بر اساس این نتایج باکتری عامل لکه تاولی و نکروز صیفی‌جات به این گونه تعلق دارند.

واژگان کلیدی: لکه تاولی، نکروز برگ‌گی، خیار، خربزه

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی،

نویسنده مسئول مکاتبات: idghasemi@yahoo.com

مقدمه

خانواده کدوییان با ۱۲۵ جنس و ۹۶۰ گونه دارای اهمیت فراوان هستند. در این گروه، هندوانه با ۴۴ درصد، خربزه با ۲۴/۸ درصد و خیار با ۵/۱۹ درصد بیش‌ترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده‌اند (بی‌نام، ۱۳۹۳). یکی از مهم‌ترین اعضای این گروه خیار سبز است. خیار یکی از تولیدات مهم در کشت‌های مزرعه و گلخانه‌های کشور است. متوسط عملکرد این محصول در کشور ۱۷/۱ تن می‌باشد. میزان تولید خیار در کشور ایران در حدود ۱/۵۶ میلیون تن برآورد شده که معادل ۲/۱۱ درصد از میزان تولید محصولات کشاورزی زراعی و ۱۶/۹ درصد از کل محصولات جالیزی است و ۹۹/۵۶ درصد از آن به صورت کشت آبی است (بی‌نام، ۱۳۹۳).

خربزه گیاهی از خانواده کدوئیان بوده که میوه‌اش درشت، شیرین و آبدار است. بوته آن کوتاه و ساقه‌هایش روی زمین می‌خوابد. کل سطح زیر کشت این محصول در سال ۲۰۰۵ میلادی، ۱/۳ میلیون هکتار با عملکرد متوسط ۲۱/۶ تن در هکتار و تولید ۲۸/۳ میلیون تن می‌باشد. متوسط عملکرد این محصول در ایران ۲۶/۱ تن در هکتار می‌باشد. ایران با تولید ۱/۲۳ میلیون تن حدود ۴/۴٪ از کل تولید این محصول را در اختیار داشته که سطحی معادل ۸۰۰۰۰ هکتار را شامل می‌شود. این دو محصول مانند سایر اعضای خانواده کدوییان در طول دوره رشدی خود و بعد از آن، تحت تأثیر آفات و بیماری‌های زیادی قرار می‌گیرند (Oneill et al., 2000). بیمارگرها در مراحل مختلف رشد از مرحله گیاهچه تا مرحله برداشت میوه می‌توانند گیاهان را بیمار کرده و در نتیجه میزان تولید و کیفیت محصول به کنترل دقیق بیمارگرها بستگی دارد (Samson et al., 2005). از بیماری‌های شایع کدوییان در ایران می‌توان به سفیدک‌پودری جالیز با عوامل *Sphaerotheca fuliginea* و *Golovinomyces cichoracearum* اشاره نمود (نقشین و همکاران، ۱۳۹۰). از جمله باکتری‌های مهم بیماری‌زایی که به کدوییان خسارت می‌زنند می‌توان به باکتری‌هایی *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* E. *tracheiphila* و *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* اشاره کرد (Alcorn et al., 1991). باکتری *P. syringae* یک بیمارگر گیاهی است که باعث نکروز در قسمت‌های هوایی گیاه می‌شود. این باکتری روی برخی از ارقام گونه‌های گیاهی حالت پارازیت اختصاصی دارد (Nazir, et al., 2010). اولین گزارش معتبر از بیماری نکروز برگ‌گی خیار همراه با شرح دقیق از بیمارگر توسط اسمیت و برایان در سال ۱۹۱۵ از ایالات متحده آمریکا منتشر شد و از آن پس این بیماری به عنوان یکی از بیماری‌های جدی خیار در ایالت متحده در نظر گرفته شد. سپس، وقوع این بیماری از روسیه، ژاپن، انگلستان و ایران گزارش شده است. این بیماری همچنین در چین، ترکیه، استرالیا، آرژانتین، برزیل و بسیاری از کشورهای اروپایی و آفریقایی گزارش شد. بنابراین این بیماری در سراسر جهان وجود دارد (Bradbury, 1986). برای مطالعه سیستماتیک، گونه‌ها و آرایش تاکسون‌های مختلف باید شناسایی و ارتباطات طبیعی بین آن‌ها به خوبی نشان داده شود (Mayden, 1997). یکی از راه‌های شناسایی موجودات و پی بردن به روابط تکاملی آن‌ها استفاده از روش‌های مولکولی و تکثیر ناحیه خاص از ژنوم آن موجود و یا موجودات مورد مطالعه است، سپس با استفاده از توالی‌یابی این قطعه تکثیر شده و مقایسه آن با سایر موجودات (که قطعه مورد نظر در آن‌ها تکثیر و توالی‌یابی شده است) پی به روابط تکاملی و یا فیلوژنتیک موجودات مورد مطالعه برده می‌شود. تعیین توالی نواحی DNA ریبوزومی و ژن‌های کدکننده پروتئین و استفاده از نشانگر مولکولی مختلف نظیر RAPD، SSR، ISSR و RFLP روش‌های مولکولی متداول مورد استفاده در سیستماتیک مولکولی باکتری‌ها هستند. ژن‌های ریبوزومی به‌طور وسیعی در مطالعات فیلوژنتیکی باکتری‌ها استفاده شده و کمک زیادی به بازسازی فیلوژنتیکی این موجودات کرده‌اند (Taylor et al., 2000). آنزیم RNA پلیمراز باکتری‌ها از پنج زیرواحد تشکیل شده است که این زیرواحدها شامل دو زیرواحد α یک زیرواحد β ، یک زیرواحد β' و زیرواحد β (151 kD) و β' (156 kD) به طور قابل توجهی از α (37 kD) بزرگ‌تر هستند. ژن *rpo B* زیرواحد β از آنزیم RNA پلیمراز باکتری‌ها را رمز می‌کند. این ژن ۱۳۴۲ آمینواسید را کد کرده، و دومین زنجیره پلی‌پپتیدی را از نظر اندازه در سلول می‌سازد. در این پژوهش برای شناسایی مولکولی و تعیین روابط بین باکتری‌های مورد مطالعه از توالی ژن

استفاده شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) با استفاده از تکثیر ژن *rpoB* صورت گرفت (Badgery-Parker, 2000). تعیین توالی DNA اکنون به صورت یک تکنیک آزمایشگاهی معمولی در آمده است و مقایسه توالی DNA ژن-های واگرا می‌تواند میزان قرابت آن‌ها را روشن سازد. ژن‌های مربوط به عملکردهای مختلف با سرعت‌های متفاوت از هم واگرایی پیدا می‌کنند، اما به‌طور کلی سرعت نسبی از هم دور شدن ژن‌ها مشابه است. بنابراین، تفاوت‌های توالی DNA بین ژن‌هایی که سریعاً از هم دور می‌شوند را برای تعیین میزان فاصله ژنتیکی ژن‌ها مشابه یکدیگر می‌توان بکار برد، و تفاوت توالی DNA بین ژن‌هایی که به آهستگی از هم دور شده‌اند، را برای ارزیابی شباهت گروه‌های باکتری‌ها که از هم دور هستند، می‌تواند کاربرد داشته باشد (Yonemura *et al.*, 2007). ریبوزوم‌ها در تولید پروتئین نقش اساسی دارند. ژن‌های رمزکننده rRNAها و پروتئین‌های ریبوزومی به‌شدت در بین گونه‌ها طی روند تکامل حفظ شده‌اند و نسبت به سایر ژن‌های کروموزومی بسیار آهسته تر واگرایی پیدا کرده‌اند (از هم دور شده‌اند). مقایسه توالی نوکلئوتیدهای RNA ریبوزومی 16s مربوط به منابع بیولوژیک مختلف نشان می‌دهد که بین ارگانسیم‌های کاملاً واگرا، ارتباطات تکاملی وجود دارد و این امر منجر به تشکیل یک فرمانرو جدید به نام آرکئوباکتری‌ها گردید (Wang *et al.*, 2003). از روش‌های دیگر دو رگه‌سازی یا هیبرید DNA با الیگونوکلئوتیدهای با تراکم بالا (پرچگال) برای شناسایی گونه‌ها استفاده شده است. در این مطالعه از ژن *rpoB* برای مطالعه و شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای خربزه و خیار سبز استفاده شد. تاکنون باکتری‌های *P. viridiflava* و *P. syringae* pv. *lachrymans* از کدوییان در ایران جداسازی شده است و باکتری دیگری به عنوان باکتری بیماری‌زا گزارش نشده است. نظر به این‌که عامل لکه تاولی و نکروز صیفی‌جات در ایران و به خصوص مازندران شناسایی نشده و عامل بیماری نامشخص است، در این تحقیق شناسایی عامل بیماری لکه تاولی و نکروز برگی خیار و خربزه در مازندران بعد از جداسازی گیاه بیمار به کمک روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی و ارتباط آن با سایر گونه‌های باکتریایی که از قبل مورد شناسایی قرار گرفته بودند، مشخص می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تهیه ایزوله باکتری

تعداد ۲۹ جدایه باکتری بیماری‌زا از گیاهان خیار و خربزه در سال‌های زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در استان مازندران جداسازی شد. نمونه‌ها از گیاهان بیمار با علائم لکه‌های آسوخته که ابتدا حالت تاولی داشته (شکل ۱ و ۲) و سپس به رنگ زرد و در نهایت نکروزه تبدیل می‌شدند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جدایه‌های شماره ۱ الی ۱۲ از روی گیاه خربزه و جدایه‌های شماره ۱۳ الی ۲۹ از گیاه خیار جداسازی شدند.



شکل ۱- علائم تغییر رنگ و زرد و تاولی شدن برگ در مراحل اولیه

Fig. 1. Symptoms of discoloration of yellow and Leaf tufts in early stages



شکل ۲- نشت الکترولیت‌ها و آبسوخته شدن برگ که در پشت برگ دیده می‌شود

Fig. 2. Electrolyte leakage and blights occurring on the lower surface of leaves

جداسازی باکتری از نمونه‌ها و اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های بیمار، اندام‌های آلوده پس از شستشو با آب معمولی و ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، در جریان هوا خشک شده و قطعات کوچکی از نواحی حد فاصل بافت سالم و بیمار در تشتک‌های پتری استریل حاوی آب مقطر استریل قرار داده و با استفاده از اسکالپل خرد شدند. پس از ۲۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون حاصله روی (NA) محیط آگار غذایی به صورت مخطط کشت و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس کلنی‌های منفرد مجدداً در محیط آگار غذایی خالص‌سازی شدند. همه این جدایه‌ها در آب مقطر استریل در یخچال و در گلیسرول ۳۰ درصد در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. (Schaad *et al.*, 2001). برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها از خیار رقم سوپر دومینوس و خربزه رقم مشهدی استفاده و بر اساس روش السزاک-ولتمن (Olczak – Woltman) عمل شد. به این صورت که از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها سوسپانسیونی با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و به روش تزریق در فاصله بین رگبرگ عمل مایه‌زنی صورت گرفت. به منظور حفظ رطوبت مناسب، ۴۸ ساعت قبل و بعد از مایه‌زنی روی کلیه گیاهان با استفاده از پوشش پلاستیکی سلوفان پوشانده شد. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. گیاهان هنگام ظهور علائم دو هفته مورد ارزیابی قرار گرفت (Olczak – Woltman *et al.*, 2008). بعد از این مرحله از گیاهان دارای علائم نمونه‌هایی به صورت تصادفی انتخاب شد و پس از ضدعفونی و شستشو فرایند جداسازی و همچنین تکرار تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی به منظور اطمینان از بیماری‌زایی باکتری مورد نظر انجام شد. برای انجام آزمون فوق‌حساسیت از گیاهان توتون و شمعدانی استفاده شد. به این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی با غلظت 10^8 تهیه و به برگ‌ها در فضای بین سلولی تزریق شد و علائم بیماری بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت که به صورت لکه‌های نکروز بود، ثبت شد (Klement *et al.*, 1964).

تعیین ویژگی‌های فنوتیپی باکتری عامل بیماری

جهت شناسایی جدایه‌های جداسازی شده، ابتدا کلیه جدایه‌ها روی محیط کشت King's B (KB) برای بررسی توانایی تولید رنگدانه فلورسنت کشت داده شدند. سپس با استفاده از آزمون‌های افتراقی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد شناسایی بیش‌تر قرار گرفتند (Schaad *et al.*, 2001). از آزمون‌های تست گرم در پتاس ۳٪، هوازی/بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسنت قابل حل در آب، اکسیداز، کاتالاز، ایجاد فوق‌حساسیت در برگ توتون، لهانیدن سیب‌زمینی، تولید لوان، آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز اسکولین و توین ۸۰، ذوب ژلاتین، احیاء نیترات، هیدرولیز نشاسته، تولید گاز H_2S از پیتون، تولید اندول، رشد در دماهای ۴ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد مطابق روش‌های متداول در منابع استفاده شد (Schaad *et al.*, 2001). آزمون تولید اسید از فروکتوز، سوکروز، زایلوز، مانوز، مالتوز و گلوکز و مصرف ال آرآیینوز،

مانیتول، ال رامنوز، زایلوز، مانوز و دی ال تارتارات به عنوان منبع کربن براساس محیط پایه آیر صورت گرفت و نتایج تا ۲۸ روز ثبت گردید (Hildebrand *et al.*, 1988). آنالیز داده‌های حاصل از آزمایشات فنوتیپی با استفاده از ماتریس صفر و یک به این صورت انجام شد، داده‌ها در صورت مثبت بودن با کد یک و منفی بودن کد صفر مشخص شد و مرتب‌سازی داده‌ها در نرم افزار Excel انجام گرفت. داده‌های حاصل به نرم افزار NTSYS PC وارد شدند. دندروگرام بین جدایه‌ها به روش UPGMA8 (Unweighted pair Group Method by Arithmetic Average) با ترسیم خوشه‌ای انجام گرفت (Rohlf, 1998).

شناسایی باکتری با روش‌های مولکولی

استخراج DNA ژنومی

ابتدا از استرین‌های باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت روی محیط NA تکثیر شده بودند سوسپانسیون با غلظت حدود 10^7 سلول در میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه شد. از روش لیز قلیایی (alkaline lysis) برای آزادسازی DNA استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر NaOH ۰/۰۵ مولار مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس سوسپانسیون به مدت دو دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی به تیوب‌های تمیز منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند و به طور مستقیم در واکنش PCR استفاده شد (Rademaker *et al.*, 2000).

تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)

برای تعیین جایگاه فیلوژنتیک استرین‌های سودوموناس از آغازگر طراحی شده از ناحیه *rpoB* توسط طیب و همکاران انجام شد (Tayeb *et al.*, 2005).

جدول ۱- آغازگرهای PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *rpoB* جدایه‌های متعلق به گروه Pseudomonads
Table 1. PCR primers used to amplify the *rpoB* genes of isolates belonging to the Pseudomonads group

آغازگر primer	توالی پرایمر Primer sequence
LAPS	(5'-TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT-3')
LAPS27	LAPS27 (5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3')

حجم نهایی مخلوط واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و متشکل از ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۸ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول) ۰/۸ میکرولیتر، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز، آب دو بار تقطیر ۴۰ میکرولیتر بود. ۴۹ μ l از مخلوط واکنش، در ویال‌های ۲۵۰ میکرولیتری ریخته شده و به هر لوله ۱ μ l از DNA ژنومی هر یک از جدایه‌ها اضافه گردید (جدول ۲). محصول PCR با دستگاه الکتروفورز افقی مینی‌ژل مدل سیگما روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه UVdoc مشاهده و عکس‌برداری شد. (Rademaker *et al.*, 2000). سپس قطعه تکثیر شده برای تعیین ترادف به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال شد. ترادف‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار کلاستال ایکس Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) ویرایش شدند و با ترادف‌های مشابه در پایگاه داده NCBI هم‌ردیف و با استفاده از نرم‌افزار مگاسیکس (MEGA6) مقایسه و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش کم‌ترین اتصال همسایه (Neighbour-joining) رسم شدند و میزان اطمینان به الگوی شاخه‌ها با ۱۰۰۰ بار فراوانی ارزیابی

شد. توالی منتشر شده جدایه *P. flavesceus* به عنوان گروه خارجی استفاده شد (Tamura et al., 2013).
(Saitou, and Nei 1987, Altschul et al., 1990).

جدول ۲- سیکل دمایی استفاده شده در PCR با استفاده از آغازگرهای laps/laps27

Table 2. Thermal cycles used in PCR using the primers laps / laps27

نوع واکنش	مرحله واکنش	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان time	تعداد چرخه Number of cycles
The type of reaction	Reaction stage	Temperature (°C)		
PCR	Initial denaturation	94	2 min	1
	Denaturation	94	40 min	
	Annealing	66	50 second	31
	Extension	72	50 second	
	Denaturation	95	5 min	1

نتایج

جداسازی عامل بیماری و آزمون بیماری‌زایی

از کشت نمونه‌های برگي خیار و خربزه جمع‌آوری شده از مازندران در مجموع ۲۹ جدایه باکتری جداسازی شد. کلنی‌های باکتری‌های جدا شده روی محیط آگار غذایی گرد با حاشیه صاف و برجسته زرد رنگ بوده و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB نکردند. باکتری عامل بیماری از همه انواع علائم برگي جداسازی شد. جدایه‌های ۱-۱۲ مربوط به لکه برگي خربزه و جدایه‌های ۱۳-۲۸ مربوط به برگ خیار می‌باشند.

بیماری‌زایی جدایه‌ها

تمام جدایه‌ها با تزریق به برگ خیار رقم سوپر دومینوس و خربزه رقم مشهدی علائم بیماری را طی دو هفته در محل تزریق نشان دادند. این نکته قابل توجه بود که مراحل بروز علائم بیماری مانند علائم مزرعه‌ای نبود و تنها نکروز برگي مشاهده شد. در گیاهانی که با آب مقطر استریل به عنوان شاخص تزریق شدند هیچ گونه علائمی مشاهده نشد. جدایه‌هایی که بیماری‌زایی آن‌ها مثبت بود جدا شده و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها بررسی شد. همچنین در بازیابی دوباره باکتری، پس از جداسازی و کشت در محیط غذایی، باکتری مورد نظر دوباره به دست آمد و آزمون‌های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی مجدد آن‌ها این موضوع را اثبات کرد. آزمون فوق‌حساسیت روی گیاه شمعدانی و توتون نیز برای تمام جدایه‌ها مثبت بود.

شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات فنوتیپی

کلنی‌های باکتری روی محیط آگار غذایی گرد با حاشیه صاف و برجسته با رنگ زرد، لزج و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB نکردند. این جدایه‌ها گرم منفی، هوازی، کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده و ایجاد واکنش فوق‌حساسیت روی توتون کردند. همچنین جدایه‌ها از نظر واکنش‌های لوان و آرژنین دهیدرولاز منفی بودند. ورقه‌های سیب زمینی توسط هیچ‌یک از جدایه‌ها لهانیده نشد، ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، توپین ۸۰ نیز منفی بوده است. از نظر تولید گاز H₂S از پپتون و تولید اندول و احیاء نیترات و مصرف نشاسته نیز تمامی جدایه‌ها منفی بودند. جدایه‌ها در چهار درجه سانتی‌گراد رشد نموده ولی در ۴۱ رشدی نشان ندادند.

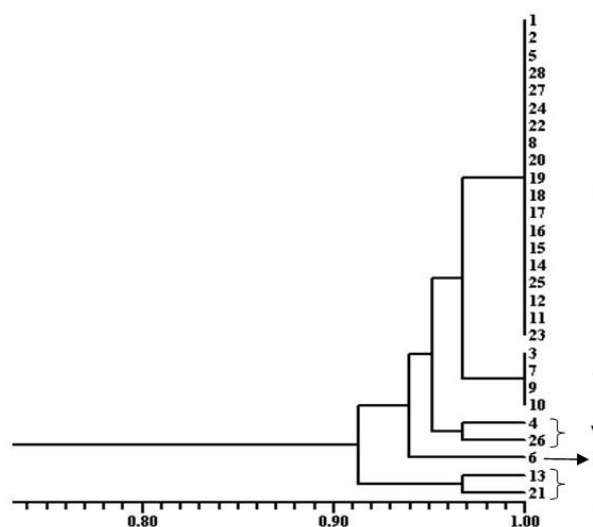
هیچ‌یک از جدایه‌ها در تولید اسید از دی-زایلوز، دی-گلوکز، دی-فروکتوز، سوکروز، مالتوز و مانوز مثبت نبودند.

جدایه‌ها در استفاده از ال آرآبینوز، دی مانیتول، دی زایلوز و مانوز مثبت بوده ولی از ال رامنوز و دی ال تارتارات استفاده نکردند (جدول ۳).

جدول ۳- ویژگی بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری عامل لکه‌برگی خیار و خربزه

Table 3. Biochemical characteristics of bacterial strains of cucumber and melon blister spot and leaf necrosis

خصوصیت فنوتیپی	Phenotype Characteristics	درصد جدایه‌های مثبت Percent of Positive strains	واکنش Reaction
آزمون گرم	Gram reaction	0	-
رشد بی هوازی	Anaerobic growth	0	-
لپیدگی ورقه‌های سیب زمینی	Potato soft rot	0	-
پیگمان فلورسنت روی محیط KB	Fluorescent pigment on KB	0	-
فعالیت اکسیداز	Oxidase activity	100	+
تولید لوآن	Levan production	0	-
دهیدرولیز آرژنین	Arginine dehydrolysis	0	-
فوق حساسیت در توتون	Tobacco HR	0	-
کاتالاز	Catalase	100	+
ذوب ژلاتین	Gelatin liquefaction	0	-
هیدرولیز اسکولین	Aesculin hydrolysis	31	-
هیدرولیز نشاسته	Starch hydrolysis	0	-
احیاء نیترات	Nitrate reduction	0	-
تولید گاز H ₂ S	H ₂ S production	0	-
تولید اندول	Indol production	0	-
مصرف توئین ۸۰	Lipase activity	0	-
تحرك	Motility	100	+
رشد در ۴ درجه سانتی گراد	Growth at 4°C	100	+
رشد در ۴۱ درجه سانتی گراد	Growth at 41°C	0	-
تولید اسید از:	Acid from:		
فروکتوز	Fructose	0	-
زایلوز	Xylose	20	-
سوکروز	Sucrose	0	-
گلوکز	Glucose	0	-
مانوز	Mannose	17	-
مالتوز	Maltose	100	+
مصرف کربوهیدرات‌های:	Use of carbohydrates		
ال آرآبینوز	L-Arabinose	100	+
مانیتول	Manitol	100	+
ال رامنوز	L-Ramnose	0	-
زایلوز	Xylose	96	+
مانوز	Mannose	96	+
دی ال تارتارات	DL-Tartrate	0	-



شکل ۳- دندروگرام گروه‌بندی جدایه‌های باکتری مورد مطالعه بر اساس صفات بیوشیمیایی

Fig. 3. Cluster analysis of bacterial strains according to phenotypic characteristics

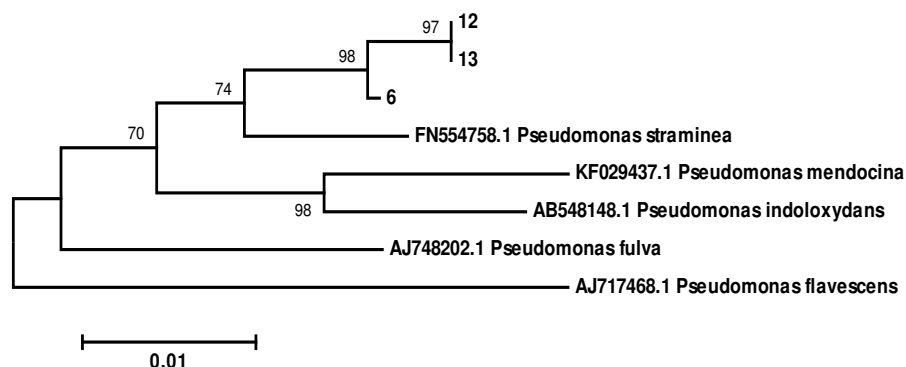
گروه‌بندی فنوتیپی جدایه‌ها

جدایه‌های مختلف جدا شده از خیار و خربزه در آزمون‌های فنوتیپی بیش از ۹۰ درصد شباهت داشتند و تنها در چند آزمون محدود تفاوت‌هایی را نشان دادند. از طرف دیگر جدایه‌های به دست آمده از گیاه خیار و خربزه از هم تفکیک نشده و در دندروگرام ترسیم شده پراکندگی معنی‌داری نداشت و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲). در شکل ۳ روابط باکتری‌های مورد مطالعه بر اساس صفات بیوشیمیایی آن‌ها ترسیم شده است. بر اساس این صفات جدایه‌های ۱، ۲، ۵، ۲۸، ۲۷، ۲۴، ۲۲، ۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱۵، ۲۵، ۱۲، ۱۱ و ۲۵ در یک گروه و سایر جدایه‌ها در گروه‌های دیگر قرار گرفتند. (در گروهی که جمعیت زیادی از استرین‌ها قرار دارند) که مخلوطی از جدایه‌های مربوط به هر دو گیاه دیده می‌شود، قرار گرفتند.

بررسی فیلوژنتیکی باکتری عامل بیماری لکه برگ خیار و خربزه براساس تعیین توالی ژن *rpoB* سه

جدایه مورد بررسی

در تکثیر ژن‌های زیرواحد بتا آنزیم RNA پلیمراز RNA Polymerase beta sub unit از جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی، یک قطعه DNA با اندازه تقریبی ۱۲۰۰ جفت بازی به دست آمد که این قطعه بعد از Run شدن بر روی ژل آگارز نشان داده شد. توالی قطعه به دست آمده از جدایه‌های باکتری‌های مورد مطالعه، در حدود ۹۹ درصد با توالی این ژن (*rpoB*) در باکتری *P. straminea* با شماره دسترسی FN554758 که در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شده بود شباهت داشته و بر اساس این مشاهدات به این گونه تعلق دارند و نزدیک‌ترین گونه بر اساس توالی ژن *rpoB*، *P. mendocina* با شماره دسترسی KF029437 بوده که شباهت کم‌تر از ۸۹ درصدی با جدایه‌های مورد مطالعه داشته است. سایر گونه‌های موجود در پایگانی NCBI شباهتی کم‌تر از این را نشان داده و کاملاً از این گونه متمایز می‌باشند (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی سه استرین *P. straminea* جدا شده از لکه‌برگی خیار و خربزه (جدایه های ۶، ۱۲ و ۱۳) در مقایسه با تعدادی از گونه‌های شناخته‌شده در جنس *Pseudomonas* موجود در پایگاه داده NCBI بر اساس توالی ژن RNA Polymerase beta subunit با استفاده از نرم افزار مگا-۶ نشان می‌دهد.

Fig. 4. Phylogenetic tree showing the relationship of the three *P. straminea* strains isolated from cucumber and melon leaf spot (6, 12 and 13). On the basis of RNA Polymerase beta subunit sequence alignment with some *Pseudomonas* species were deposited in NCBI that was constructed using the neighbor-joining method of Mega6 software.

بحث

در این مطالعه جدایه‌های باکتری از گیاهان خربزه و خیار سبز در استان مازندران جداسازی شدند. این جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی نزدیک به گونه *P. straminea* تشخیص داده شدند و بعد از تعیین ترادف ژن *rpoB* از جدایه *P. flavescens* که به عنوان نماینده انتخاب شد بیش‌ترین شباهت در سطح ۹۵ درصد را با گونه *P. straminea* داشت. همان‌طور که می‌دانیم در تعریف گونه باکتریایی، گونه به مجموعه‌ای از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که بیش از ۸۵ درصد شباهت بیوشیمیایی داشته باشند.

P. straminea باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است و شامل استرین‌هایی می‌شود که قبلاً به نام *P. ochracea* شناخته می‌شد، اما بر اساس آنالیز 16S rRNA این باکتری در گروه باکتری‌های *P. aeruginosa* قرار گرفت. در سال ۲۰۰۰ به وسیله آنجیو و همکاران اصلاحاتی در مورد باکتری *P. straminea* (Iizuka and Komagata 1963) با استفاده از اطلاعاتی که جدیداً به دست آمد انجام شد (Uchino et al., 2001). و نام این باکتری به باکتری *P. straminea* اصلاح شد. در سال ۱۹۶۳ با مطالعاتی به وسیله Iizuka and Komagata انجام شد تعداد زیادی از استرین‌های باکتری *Pseudomonas* از شلتوک برنج و همچنین دانه‌های برنج جداسازی شد. باکتری *P. straminea* از شالیزارهای برنج در ژاپن جداسازی شد و به وسیله صفاتی مانند تولید رنگدانه‌های نامحلول در آب و همچنین تولید رنگدانه‌های سبز رنگ محلول در آب مورد شناسایی قرار گرفت (Iizuka and Komagata, 1963). نامگذاری این گونه توسط اسکرمین و همکاران تایید شد و نام خاص آن (specific epithet) برگرفته از واژه‌ای لاتین به نام *stramineus* به معنی ساخته شده از نی است. *P. straminea* در لیست باکتری‌های مورد تأیید (Approved Lists of Bacterial Names) ثبت شده‌اند (Skerman et al., 1980)، اما به کار بردن آن یک غلط املائی از روی توصیف اولیه این باکتری است. *P. straminea* یک منوتیپ است و استرین تیپ آن CB-7T است. دو استرین از *P. straminea* (KM 501T) و (KM 502T) در کلکسیون کشت‌ها وجود دارند و این دو استرین هم از CB-7T مشتق شده‌اند.

کودوما و همکاران (Kodama et al., 1985) بر روی باکتری‌های گرم منفی، دارای رنگدانه‌های زرد رنگ واکسیداز منفی میله‌ای شکل، مطالعاتی انجام دادند. استرین‌هایی که آن‌ها از مزارع برنج جداسازی کردند به نام *P. oryzae* نام

نامیده شدند و تعدادی استرین‌هایی که نمونه‌های بالینی بودند به نام *P. luteola* نامگذاری شدند. سپس هیلدبراند و همکاران (Hildebrand *et al.*, 1994) باکتری‌هایی با رنگدانه‌های زرد رنگ و فلورسنت را از شانکرهای گیاه گردو جداسازی کردند و این طور نتیجه‌گیری کردند که این‌ها یک گونه جدید هستند و آن‌ها را *P. flavescens* نامیدند. بهرنت و همکاران جداسازی باکتری‌های تولید کننده رنگدانه‌های زرد رنگ را از فیلوسفر علف‌ها و غلات گزارش کردند و این باکتری‌ها را *P. graminis* نامیدند (Behrendt *et al.*, 2002). در مطالعه‌ای که به وسیله Uchino و همکاران در سال ۲۰۰۰ انجام شد همه مشخصات مورفولوژیکی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی دو باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. این دو باکتری صفات فنوتیپی مشابه با آنچه که ایزوکا و کوماگاتا (Iizuka Komagata, 1963) توصیف کرده بودند نشان دادند. سلول‌های هر دو باکتری *P. straminea* و *P. ochracea* گرم منفی و میله‌ای شکل بودند و اندازه آن‌ها ۰/۴ - ۰/۶ تا ۲۰-۱۶ میکرومتر با لبه‌های گرد بودند و این باکتری‌ها متحرک بودند و دارای یک تاژک قطبی تنها بودند.

با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، دامنه میزبانی و آنالیز ترادف ژن *rpoB* به نظر می‌رسد این جدایه همان *P. straminea* باشد. هر چند که برای اثبات این فرضیه به بررسی‌های بیش‌تر از جمله تعیین ترادف چند ژن خانه‌دار و انجام آنالیزهای فیلوژنتیک بر اساس ترادف آن‌ها برای تعیین دقیق گونه نیاز می‌باشد. علاوه بر این لازم است که مطالعات گسترده‌تری روی باکتری‌های مولد لکه‌برگی و علائمی مانند این روی میزبان‌های بیش‌تری از گیاهان زینتی در مناطق مهم تولید محصولات خربزه و خیار جهت دستیابی به راه‌های کنترل بهتر این بیمارگر انجام پذیرد.

آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc2.02 فاصله ژنتیکی جدایه‌ها را ترسیم نموده و تحلیل آن‌ها را آسان‌تر می‌نماید (Rohlf, 1998). بر اساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی، فیزیکی و تغذیه‌ای با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc2.02 اکثر جدایه‌ها به هم شبیه بودند و در یک گروه قرار گرفتند. اکثر این جدایه‌ها با هم شباهت داشتند و بیانگر منشا مشترک استرین‌های عامل بیماری می‌باشد. که میزان این تفاوت‌ها در بین گونه‌های مختلف یک جنس یا زیرگونه و پاتووارهای یک گونه بیش‌تر مشاهده می‌شود (شکل ۲). جدایه‌های مطالعه شده در این تحقیق از لحاظ فنوتیپی نزدیک به هم و تقریباً همگن بودند ولی بر اساس آنالیز عددی داده‌های حاصل از تنوع ژنتیکی می‌توان گفت که از لحاظ ژنتیکی ناهمگن هستند و این تنوع به منطقه جغرافیایی بستگی ندارد که این نتیجه با نتایج دیگر مطالعات مطابقت داشت (Olczak – Woltman *et al.*, 2008). در این پژوهش‌ها با وجود شباهت‌های زیاد بین استرین‌های مختلف از لحاظ فنوتیپی، تفاوت‌های ژنتیکی محدود بین آن‌ها دیده می‌شود که ممکن است حتی پاتووارهای مربوط به یک منطقه جغرافیایی که دامنه میزبانی متفاوتی دارند، از نظر ژنوتیپ شباهت زیادی به یکدیگر نداشته باشند اما به استرین‌های دیگر در مکانی دیگر شباهت بیش‌تری داشته باشند و در واقع شباهت ژنتیکی بین استرین‌ها به منشأ جغرافیایی آن‌ها بستگی ندارد.

با توجه به مباحثی که تا اینجا مطرح شد و نتایج این تحقیق، استفاده از روش‌های شناسایی غیرمولکولی در مورد باکتری‌ها (مانند تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) علاوه بر این‌که قادر به شناسایی گونه‌های نزدیک به هم نیست، مشکل دیگری نیز دارد و آن مشکل تفسیر و قضاوت در مورد نتایج این تست‌ها می‌باشد (Stager and Davis, 1992). تعداد زیادی از برنامه‌های کامپیوتری ابداع شده‌اند که در این مورد راهگشا هستند، ولی هیچ یک نتوانستند به طور کامل مشکل را برطرف کنند. یکی از این سیستم‌ها سیستم کروماتوگرافی مایع-گاز (MIDI) است (Newark, Del.). که بر اساس پروفایل اسید چرب سلول بنیان نهاده شده است (Von Graevenitz *et al.*, 1991). استفاده از صفات ژنومی به عنوان جایگزینی برای شناسایی باکتری‌ها در سال‌های اخیر معرفی شده است، البته در خیلی از موارد این دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی به صورت مکمل هم قرار می‌گیرند (Maurin *et al.*, 1994). همان‌طور که قبلاً ذکر شد استفاده از ژن‌هایی که در طول تکامل معمولاً حفاظت شده باقی می‌مانند برای استفاده در زمینه فیلوژنی مولکولی بسیار معمول می‌باشد (مانند ژن *16S rRNA*). متعاقب استفاده از این ژن‌ها به طور گسترده‌ای آغازگرهایی که یک قطعه خاص حفاظت

شده از ژنوم باکتری‌ها را مورد فرایند تکثیر قرار بدهند، معرفی شده‌اند (Winstanley *et al.*, 1993). بعد از تکثیر این قطعه از ژنوم توالی آن با سایر باکتری‌هایی که مورد شناسایی قرار گرفته‌اند مورد مقایسه قرار می‌گیرد. در این تحقیق نیز تکثیر و تعیین توالی قطعه حفاظت شده آر‌ان‌ای پلیمرز زیر واحد بتا (RNA Polymerase beta subunit) به خوبی توانست جایگاه فیلوژنتیکی استرین‌های عامل بیماری لکه تاولی کدوپیان را مشخص و گونه آن را از سایر گونه‌های نزدیک تفکیک نماید و با توجه با اهمیت اقتصادی کدوپیان و به‌خصوص خیار و کاهش کیفیت و کمیت این محصول توسط باکتری *P. straminea*، عامل لکه تاولی و نکروز برگ خیار و خربزه، با شناسایی بهتر عامل این بیماری می‌توان بیولوژی این باکتری را مشخص نمود و در زمان مناسب جهت کنترل این بیماری اقداماتی را در پیش گرفت و از گسترش این عامل می‌توان جلوگیری نمود.

References

منابع

- بی‌نام، ۱۳۹۳. آمارنامه کشاورزی، جلد اول محصولات زراعی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی، صفحه ۷۶-۸۱.
- نقشین، ف. و محمدخانی امین‌آبادی، م. ۱۳۹۰. بررسی کاربرد قارچکش‌های مختلف به همراه روش‌های مدیریت تلفیقی جهت کنترل بیماری سفیدک پودری (سطحی) جالیز در کشت خربزه استان اصفهان، نخستین همایش ملی تولید و فرآوری خربزه، تربت جام.
- Alcorn, S. M., Orum, T. V., Steigerwalt, A. G., Foster, J. L. M., Fogleman, J. C., and Brenner, D. J. 1991. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 197-212.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal Molecular Biology 215: 403-410.
- Badgery-Parker, J. 2010. Commercial Greenhouse Cucumber Production. Industry and Investment, NSW, Australia.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D. and Suzuki, K. 2002. Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary 52: 1441-1454.
- Bradbury, J. F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, p. 329.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. and Sands, D. C. 1988. Pseudomonas. Pp. 60-80. In: Schaad, N. D. (ed.) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, USA.
- Iizuka, H., and Komagata. K. 1963. Taxonomy of the genus Pseudomonas with special reference to their modes of metabolism of carbon compounds. The Journal of General and Applied Microbiology 9: 83-95.
- Klement, Z., Farkas, G. L. and Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54: 474-7.
- Kodama, K., Kimura, N. and Komagata, K. 1985. Two new species of Pseudomonas: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens. International Journal of Systematic Bacteriology 35: 467-474.
- Maurin, M., Roux, V., Stein, A., Ferrier, F., Viraben, R., and Raoult D. 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. Journal of Clinical Microbiology 32:1166-1171.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pp. 381-424. In: Claridge, M. F., Dawah, H. A. and Wilson, M. R. (eds.). Species: The units of biodiversity, The Systematic Association Special Volume Series 54. London: Chapman and Hall.

- Nazir, A., Bhat, K. A. Bhat, M. Y., Zargar, M. A., Teli, M. N. and Zargar, S. M. 2010.** Current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv.) of cucumber: A review. International Journal of Current Research 001-011.
- Olczak – Woltman, H., Schollenberger, M., Mądry, W. and Niemirowicz –Szczytt, K. 2008.** Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). European Journal of Plant Pathology 122: 385 -393.
- O'Neill T. M., Bennison, J. A. and Gaze, R. Z. 2000.** Pests and diseases of protected vegetables and mushrooms. Pp. 317-324. In: Alfered, D. V. (ed) Pest and disease management handbook. Published for the British crop protection council by BlackWell Science.
- Rademaker, J. L. W, Hoste B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., Bruijn, F. J. de 2000.** Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 665–677.
- Rohlf, F. J. 1998.** NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02. Exeter Publications, Setauket, New York.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biological Evolution 4: 406–425.
- Samson, R., Legendre, J. B. and Christen, R. 2005.** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1-13.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001.** Laboratory Guide For The Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed. APS Press, St. Pual, Minnesota, USA. 373 pp.
- Skerman, V. B. D., Mc Gowan, V. and Sneath, P. H. A. 1980.** Approved lists of bacterial names. Int International Journal of Systematic and Bacteriology 30: 225–420.
- Stager, C. E., Davis, J. R. 1992.** Automated systems for identification of microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 5: 302–327.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar S. 2013** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Tayeb, A. L., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. 2005.** Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. Microbiology 156: 763-773.
- Taylor, J. H., Brown, K. L., Toivenen, J. and Holah, J. T. A. 2000.** Microbiological evaluation of warm air hand driers with respect to hand hygiene and the washroom environment. Journal of Applied Microbiology 89: 910–919
- Uchino, M., Shida, O., Uchimura, T. and Komagata, K. 2001.** Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremocricolorata* sp. nov. The Journal of General and Applied Microbiology 47: 247–261.
- von Graevenitz, A., Osterhout, G. and Dick, J. 1991.** Grouping of some clinically relevant gram-positive rods by automated fatty acid analysis. Diagnostic implications. APMIS. 99: 147–154.
- Wang, H., Deng, F., Pijlman, G. P., Chen, X., Sun, X., Vlak, J. M. and Hu, Z. (2003).** Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome. Virus Research, 97: 57–63.
- Winstanley, T. G., Limb, D. I., Wheat, P. F. and Nicol, C. D. 1993.** Multipoint identification of Enterobacteriaceae: report of the British Society for Microbial Technology collaborative study. Journal of Clinical Pathology 46: 637–641.
- Yonemura, I., Nakada, K., Sato, A., Hayashi, J., Fujita, K., Kaneko, S. and Itaya, M. 2007.** Direct cloning of full-length mouse mitochondrial DNA using a *Bacillus subtilis* genome vector. Gene 391: 171–177.