



خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس ساواستانی، جدا شده از یاسمن زمستانی در شیراز، با استفاده از روش BOX-PCR

گیلدا نجفی پور^{۱*}، سولماز حسنی^۲، سید محسن تقوی^۳

^۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گیاه پزشکی، ^۲ کارشناس ارشد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ^۳ استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

چکیده

سابقه و هدف: یاسمن زمستانی، گیاهی از خانواده زیتون می باشد که در زیباسازی فضاهای شهری کاربرد دارد. گال سرشاخه ناشی از سودوموناس ساواستانی یکی از بیماری های مهم در این گیاه می باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس ساواستانی جدا شده از یاسمن زمستانی در شیراز، با استفاده از روش BOX-PCR انجام گردید.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت تجربی بر روی ۲۳ جدایه سودوموناس ساواستانی جدا شده از یاسمن زمستانی شیراز انجام شد. به منظور ردیابی مستقیم از آغازگر IAAL و روش PCR استفاده گردید. بررسی تنوع ژنتیکی سودوموناس ساواستانی با روش rep-PCR و آغازگر BOX انجام شد. در ادامه داده های مرتبط با خصوصیات فنوتیپ جدایه های مورد بررسی به کمک نرم افزار NTsys-PC آنالیز گردید.

یافته ها: بر اساس آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی، سویه ها در سطح ۸۸٪ با یکدیگر تشابه داشتند، اما گروه بندی خاصی برای آن ها مشاهده نگردید. با استفاده از آغازگر اختصاصی IAAL و عصاره گال در بافر GES، قطعه DNA با اندازه تقریبی ۴۵۴ جفت باز تکثیر شد. با استفاده از نرم افزار NTsys-pc در آزمون rep-PCR و آغازگر BOX، مشخص شد که جدایه ها در سطح تشابه ۸۱٪، به سه کلاستر تقسیم می شوند. کلاستر اول شامل جدایه های یاسمن زمستانه شیراز، کلاستر دوم شامل جدایه خرزهره تهران و کلاستر سوم دربرگیرنده جدایه زیتون تهران و جدایه استاندارد بود.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که با استفاده از آغازگر BOX می توان جدایه های سودوموناس ساواستانی متعلق به مناطق مختلف و میزبان های متفاوت را از یکدیگر تفکیک نمود. همچنین مطالعه حاضر اولین گزارش ردیابی مستقیم باکتری سودوموناس ساواستانی از گال گیاهان آلوده در ایران می باشد.

واژگان کلیدی: یاسمن زمستانه، BOX-PCR، سودوموناس ساواستانی.

پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۲

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۲

مقدمه

پوشش گل هستند، سرشار از گل بوده و بنابراین در زیباسازی فضای شهری اهمیت زیادی می یابد. امروزه در بسیاری از کشورهای اروپائی مانند فرانسه که زمستان سردی دارند، این گیاه به وفور به عنوان پوشش گیاهی شهری مورد استفاده قرار می گیرد (۲). از مزیت های دیگر یاسمن زمستانه، می توان به توانایی رشد در سطوح شیب دار و اراضی ناهموار، تحمل

گیاه یاسمن زمستانی (*Jasminum nudiflorum*)، درختچه ای است از خانواده Oleaceae، زیتنی و بالارونده با گل های زرد رنگ که موطن اصلی آن کشور چین می باشد (۱). یاسمن زمستانی در فصل زمستان که بسیاری از گیاهان زیتنی فاقد

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گیاه پزشکی.
تلفن: ۰۹۱۷۳۰۸۹۴۳۵
پست الکترونیک: gilda_najafi@yahoo.com

مطلوب آلودگی هوا و نیز مقاومت نسبت به گرمای شدید تابستان اشاره نمود (۳).
 با توجه به موارد ذکر شده می توان چنین دریافت که استفاده از یاسمن زمستانی گزینه مطلوبی جهت زیباسازی فضای شهری در ایران می باشد. بنابراین لازم است عواملی که میزان گلدهی و زیبایی این گیاه را کاهش می دهند، شناسایی و کنترل گردند. موارد مختلفی سلامت، گل دهی و در نتیجه زیبایی یاسمن زمستانی را تهدید می کند که از مهم ترین آنها می توان به شته، سوسک ژاپنی و بیماری گال سرشاخه ناشی از باکتری سودوموناس ساواستائوی (۴). در همان سال عامل بیماری، بر روی خزرهره نیز از تهران گزارش گردید (۵). پس از آن در سال ۱۳۹۰ از یاسمن زمستانی در شیراز جداسازی و از لحاظ خصوصیات فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج آن مطالعه عنوان گردید که این سویه ها از همولوژی بالای فنوتیپی برخوردار می باشند (۶).
 این مطالعه با هدف بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس

جدول ۱: لیست جدایه های سودوموناس ساواستائوی مورد استفاده در این مطالعه

کد جدایه	میزبان	محل جداسازی	منبع
SH 1	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 2	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 3	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 4	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 5	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 6	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 7	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 8	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 9	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 10	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 11	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 12	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 13	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 14	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 15	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 16	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 17	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 18	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 19	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 20	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 21	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 22	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
SH 23	یاسمن زمستانی	شیراز، ایران	بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
IVIA-1628.3	زیتون	اسپانیا	---
OLIVET	زیتون	ساری، ایران	---
KHT	خزرهره	تهران، ایران	---

در روش سوم، از رقت های 10^{-1} تا 10^{-9} cfu/ml سوسپانسیون گال به عنوان DNA الگو استفاده گردید.

در روش چهارم، یک گرم گال در هاون چینی توسط ازت مایع خرد شد. مقدار یک میلی لیتر از بافر (Guanidine Thiocyanate Buffer) GES شامل ۰/۱ مولار گلیسین-NaOH (۹ pH)، ۵۰ میلی مولار NaCl، ۱ میلی مولار EDTA و ۰/۵٪ (v/v) تریتون X-100 به آن اضافه گردید. یک میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی کاغذ نیتروسولوز قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95°C حرارت داده شد. سپس کاغذ تیمار شده در اپندورف ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و مقدار ۵ μl از بافر GES به آن اضافه گردید. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95°C حرارت داده شد و به عنوان DNA الگو در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

د) واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR): به منظور تکثیر ژن *iaaL* از پرایمرهای اختصاصی ۳'-GGCACCAGCGCAACATCAA-۵' IAAALF و ۳'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-۵' IAALR استفاده گردید (۱۰). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۰/۲ میلی مولار)، ۳ میکرولیتر MgCl_2 (غلظت ۱/۵ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۱/۵ واحد) انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94°C درجه سانتی گراد و در ادامه 35°C چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 92°C درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای 62°C درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای 72°C درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای 72°C درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۰). سپس محصول PCR در ژل ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی، به منظور تشکیل باندها 454°C

ساواستائوی جدا شده از یاسمن زمستانی در شیراز، با استفاده از نرم افزار NTsys-pc Version ۲.۰۲ و روش BOX-PCR انجام گرفت.

مواد و روش ها

الف) سویه های باکتریایی: در این پژوهش، ۲۳ سویه سودوموناس ساواستائوی موجود در بخش گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (جدا شده از یاسمن زمستانی) (۶)، به همراه جدایه های مولد گال باکتریایی زیتون و خرزهره ارسالی از تهران و جدایه استاندارد IVIA-1657.8 و IVIA-1628.3 از اسپانیا مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این از یک جدایه سودوموناس سیارینگی پاتووار سیارینگی (*P. syringae pv. syringae*) نیز به عنوان Out group استفاده شد (جدول ۱).

ب) آماده سازی نمونه ها: سوسپانسیونی از باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml ($\text{OD}_{600} = 1$) تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در ادامه به مدت یک دقیقه بر روی یخ قرار گرفت (۷ و ۸). سپس به مدت ۵ دقیقه در دور 11000g سانتریفیوژ گردید. از فاز رویی به طور مستقیم در PCR استفاده شد (۹).

ج) ردیابی سودوموناس ساواستائوی به طور مستقیم از گال گیاهان آلوده: به منظور ردیابی مستقیم باکتری در گال گیاهان بیمار، از چهار روش مختلف استفاده شد تا مشخص گردد کدامیک از این روش ها قادر است بدون خالص سازی باکتری، شناسایی آن را انجام دهد. در روش اول به منظور ردیابی باکتری در گال های گیاهان مبتلا به بیماری، یک گرم بافت گال در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل خرد شد. پس از حرارت دادن در دمای 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون حاصل به عنوان DNA الگو استفاده گردید.

در روش دوم، از یک میکرولیتر سوسپانسیون مورد استفاده در روش اول به علاوه یک میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آماده شده با روش یائیش (Yaish) (۹)، به طور مخلوط به عنوان DNA الگو در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

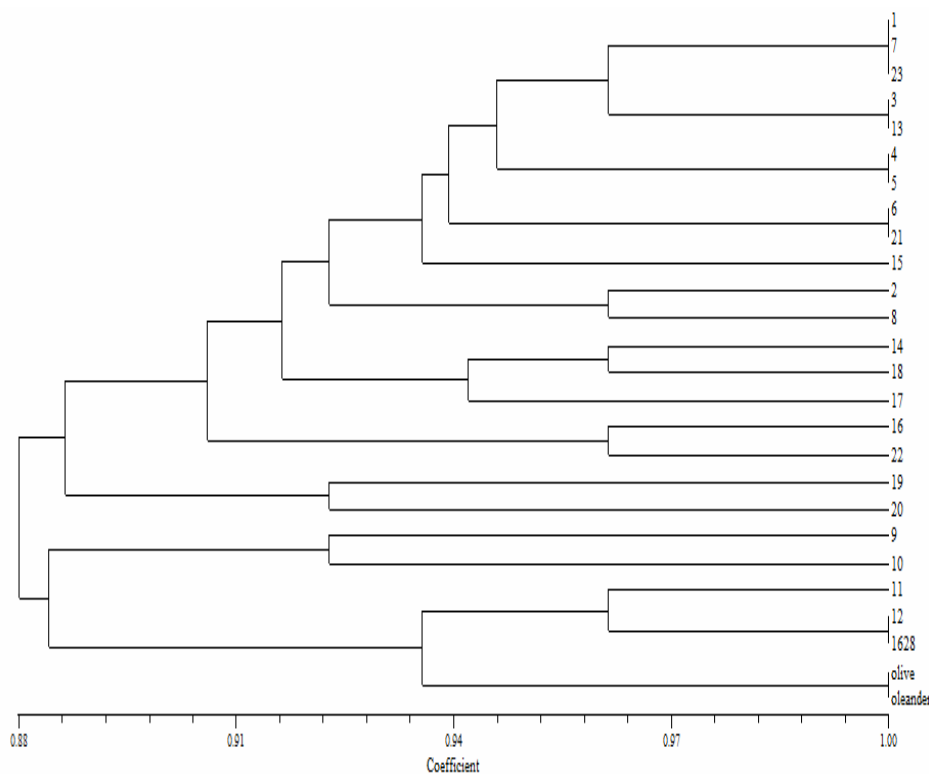
جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت.

درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ثانیه و ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد (۱۱).

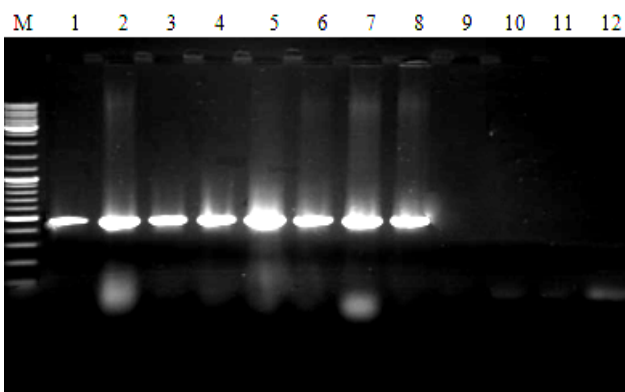
و) آنالیز داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی: به منظور آنالیز داده های فنوتیپی از نتایج به دست آمده توسط تقوی (Taghavi) و حسنی (Hassani) استفاده شد (۶). با استفاده از

نرم افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTsys-pc Ver. 2.02) فاصله جدایی‌ها ترسیم شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام گرفت. به منظور بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Un weighted Pair- group method using Arithmetic Average (UPGMA) و ضریب تشابه Simple Matching (SM) استفاده شد (۱۳).

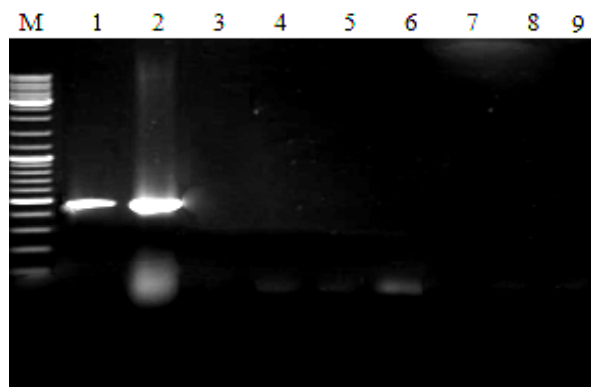
ه) BOX-PCR. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی سودوموناس ساواستائوی از روش rep-PCR و آغازگر BOX استفاده شد (۱۱). بر این اساس از آغازگر BOXAIR برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده استفاده گردید (۱۲). ترادف آغازگر مورد استفاده شامل CTACggCAAggCgACgCTgACg بود. لازم به ذکر است ترادف Box تنها دارای یک آغازگر می باشد (۱۲). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۶ میکرولیتر شامل ۲/۶ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۴ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۴۵ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۰/۲ میلی مولار)، ۳ میکرولیتر MgCl₂ (غلظت ۱/۶ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر سوسپانسیون جوشانده باکتری به عنوان DNA الگو (غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۲ واحد) انجام گردید واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با شرایط دمایی ۲ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵



شکل ۱: دندروگرام رسم شده بر اساس ویژگی های فنوتیپی جدایی‌های سودوموناس ساواستائوی. (مشخصات جدایی‌ها در جدول ۱ ذکر شده است).



شکل ۳: نتایج الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از سوسپانسیون حاصل از چهار روش ردیابی مستقیم بیمارگر در گال و آغازگرهای اختصاصی *iaaLF/iaaLR* (M) سایز مارکر (1Kb)، ستون های ۱ تا ۴) سودوموناس ساواستائوی جدا شده از یاسمن زمستانی، ستون ۵) جدایه استاندارد *IVIA1628.3*، ستون های ۶ تا ۸) سوسپانسیون گال، تیمارشده با کاغذ نیتروسولوز و بافر GES، ستون ۹) سوسپانسیون گال حرارت دیده، ستون ۱۰) مخلوط حرارت دیده سوسپانسیون گال و باکتری، ستون های ۱۱ و ۱۲) رقت 10^{-5} مربوط به سریال رقت از سوسپانسیون گال.

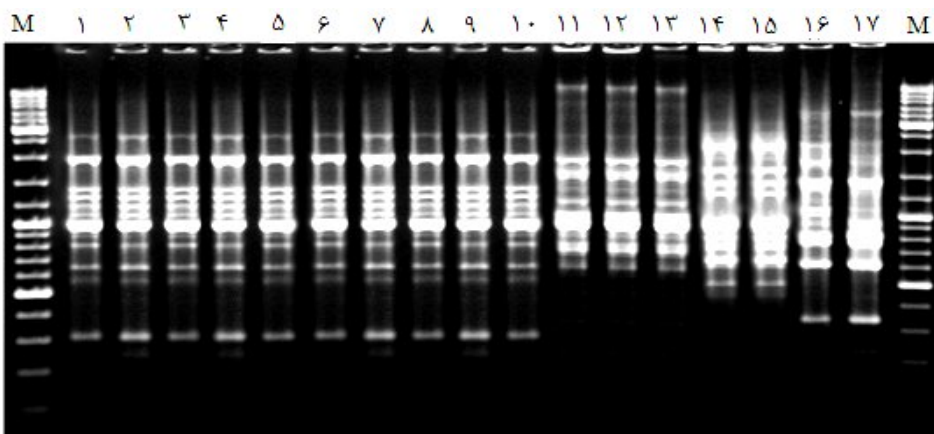


شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از سوسپانسیون حاصل از سریال رقت گال و آغازگرهای اختصاصی *iaaLF/iaaLR* (M) سایز مارکر (1Kb)، ستون ۱) سودوموناس ساواستائوی جدا شده از یاسمن زمستانی، ستون ۲) جدایه استاندارد *IVIA1628.3*، ستون های ۳ تا ۹) به ترتیب سریال های رقت از 10^{-2} تا 10^{-8} تهیه شده از سوسپانسیون گال.

خصوصیت فنوتیپی به صورت کدهای صفر (برای خصوصیات منفی) و یک (برای خصوصیات مثبت) و مشخصات ژنوتیپی بر اساس BOX-PCR به صورت کدهای صفر (برای عدم باند) و یک (برای وجود باند) در این نرم افزار تعریف گردید. این نرم افزار توانایی تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم دندروگرام (نمودار شاخه درختی) را داراست. بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی بر اساس BOX-PCR، دندروگرام مربوط به جدایه های مورد بررسی، توسط این

نرم افزار رسم گردید (۱۳).

ز) بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک ها: به منظور انجام این آزمون از محیط آگار مغذی استفاده شد. یک یا دو قطره از سوسپانسیون باکتری در سطح محیط پخش و سپس دیسک های حاوی آنتی بیوتیک بر سطح آن قرار داده شد. نتایج پس از



شکل ۴: نتایج الکتروفورز محصولات PCR سویه های مختلف سودوموناس ساواستائوی با استفاده از آغازگر BOX (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون های ۱ تا ۱۰) جدایه های یاسمن زمستانی از مناطق مختلف شهر شیراز، ستون های ۱۱ تا ۱۳) جدایه های خرزهره ارسالی از تهران، ستون ۱۴) جدایه زیتون ارسالی از تهران، ستون ۱۵) جدایه استاندارد *IVIA1628.3*، ستون ۱۶) سویه سودوموناس سیارینگی جدا شده از یاسمن زمستانی شیراز، ستون ۱۷) سویه سودوموناس سیارینگی جدا شده از هلو دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

دیده، مخلوط حرارت دیده* سوسپانسیون گال و باکتری و تهیه رقت از سوسپانسیون گال با شکست مواجه و ردیابی مستقیم باکتری امکان پذیر نشد. تنها با استفاده از کاغذ نیتروسلولز و بافر GES، قطعه ۴۵۴ جفت بازی مورد انتظار تشکیل شد (شکل های ۲ و ۳).

ج) *BOX-PCR*: در این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی باکتری از روش rep-PCR و آغازگر BOX استفاده شد (۱۱). ۱۰ جدایه سودوموناس ساواستائوی که از مناطق مختلف شیراز جمع آوری شده بود، به همراه دو جدایه از زیتون و خرزهره و نیز جدایه استاندارد IVIA1628.3 در این آزمون مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از آغازگر BOX قطعاتی با اندازه تقریبی ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز تکثیر شدند (شکل ۴).

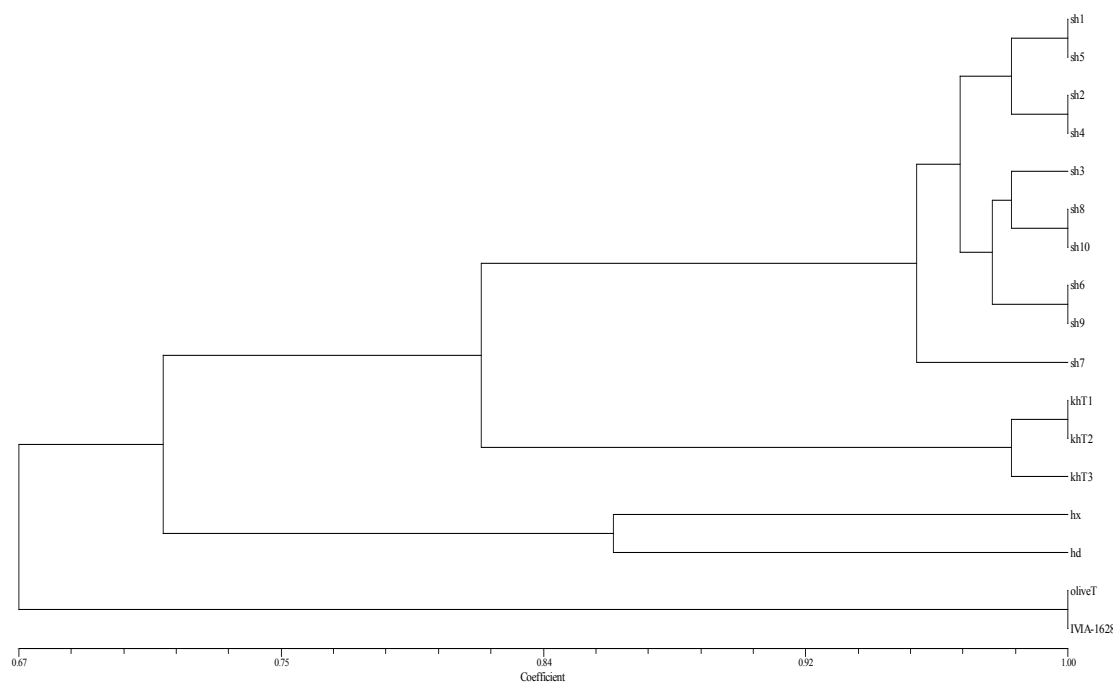
د) *آنالیز داده های ژنوتیپی*: با استفاده از نرم افزارهای Total lab (v1.1) و Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTsys-pc Version 2.02) فاصله ژنتیکی جدایه ها ترسیم شد. نتایج حاصله نشان داد که جدایه ها در سطح ۸۱٪، به چهار کلاستر تقسیم می شوند (شکل ۵). کلاستر

یک هفته بر اساس وجود یا عدم هاله بازدارندگی ارزیابی شد (۸). آنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل اریترومایسین (۱۵ μg)، پنی سیلین (۳۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg) و آموکسی سیلین (۲۵ μg) (Merc Co., Germany) بود.

یافته ها

الف) *آنالیز عددی ویژگی های فنوتیپی با استفاده از نرم افزار NTSYS*: نتایج این آنالیز نشان داد که ۲۳ سویه مورد مطالعه، در سطح ۸۸٪ با یکدیگر تشابه داشتند. جدایه ها در گروه های مختلف پراکنده بوده و گروه بندی خاصی برای آن ها قابل مشاهده نبود. در این میان جدایه های زیتون و خرزهره تهران ۱۰۰٪ با یکدیگر همولوژی نشان دادند. همچنین جدایه اسپانیا و یک جدایه از فارس (۱۲) نیز همولوژی کامل با یکدیگر داشتند (شکل ۱).

ب) *ردیابی سودوموناس ساواستائوی در گال گیاهان آلوده*: برای این منظور از چهار روش مختلف استفاده گردید. از این میان، سه روش شامل استفاده از سوسپانسیون گال حرارت



شکل ۵: دندروگرام حاصل از آنالیز داده های ژنوتیپی با استفاده از آغازگر BOX مربوط سویه های سودوموناس ساواستائوی جدا شده از یاسمن زمستانی در شیراز (مشخصات جدایه ها در جدول ۱ آمده است).

ساواستائوی در گال گیاهان بیمار، از چهار روش مختلف استفاده شد تا مشخص گردد کدام یک از این روش‌ها قادر است بدون خالص سازی باکتری، شناسایی آن را انجام دهد.

DNA الگو حاصل از این چهار روش، با استفاده از آغازگر اختصاصی *IaaLF* و *IaaLR* در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). از میان این روش‌ها، تنها در روش چهارم که از کاغذ نیتروسولوز و بافر GES استفاده شده بود، باکتری به طور مستقیم در گال ردیابی شد. در روش اول نتیجه ای حاصل نشد که به نظر می‌رسد علت آن وجود مواد بازدارنده در گیاه و یا عدم وجود باکتری در گال باشد. به همین دلیل به منظور رفع ابهام در رابطه با وجود یا عدم باکتری در گال از روش دوم استفاده شد. در این روش، یک میکرولیتر از سوسپانسیون گال با یک میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مخلوط شده و به عنوان DNA الگو استفاده گردید. در این مورد نیز شناسایی باکتری امکانپذیر نشد. احتمالاً بازدارنده‌های موجود در بافت گیاهی مانع از تشکیل باند، حتی در حضور باکتری می‌شدند. بنابراین برای رفع این مشکل از روش سوم استفاده گردید. در این روش از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} برای از بین بردن و رقیق کردن مواد بازدارنده گیاهی استفاده شد (شکل ۲). ولی ظاهراً با تهیه رقت از سوسپانسیون گال، غلظت باکتری‌های موجود در سوسپانسیون نیز کاهش یافته و باکتری قابل ردیابی نبود. تنها در روش چهارم و با استفاده از کاغذ نیتروسولوز، بازدارنده‌های عصاره گیاهی مهار شده و ردیابی باکتری بیماری‌زا با روش PCR امکانپذیر شد (شکل ۳). این نتایج نشان داد که با استفاده از کاغذ نیتروسولوز می‌توان سودوموناس ساواستائوی را سریعاً و به طور مستقیم از بافت گال ردیابی کرد.

با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی *iaaLF* و *iaaLR*، قطعه DNA با اندازه تقریبی ۴۵۴ جفت باز تولید شد. این نتیجه تاییدی بر وجود ژن *iaaL* (IAA-lysine synthetase) در جدایه‌های مورد بررسی است. بررسی‌های مختلف نشان داده پیشرفت گال‌ها در گیاه مرتبط با تولید فیتوهورمون‌های ایندول استیک اسید (IAA) و سیتوکینین می‌باشد (۲، ۱۰ و ۱۵). دو آنزیمی که در بیوسنتز IAA درگیر هستند،

اول شامل جدایه‌های یاسمن زمستانه شیراز، کلاستر دوم شامل جدایه خرزهره تهران، کلاستر سوم شامل جدایه سودوموناس سیارینگی پاتنوار سیرینگی و کلاستر چهارم در برگ‌برنده جدایه زیتون تهران و جدایه استاندارد بود. (ه) آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها: در این آزمون تمامی جدایه‌ها نسبت به اریترومایسین و پنی‌سیلین مقاوم و نسبت به تتراسایکلین و آموکسی‌سیلین حساسیت داشتند.

بحث

در مطالعه حاضر، داده‌های حاصل از بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سودوموناس ساواستائوی با استفاده از روش rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیز داده‌های مرتبط با خصوصیات فنوتیپ جدایه‌های مورد بررسی از نرم افزار Ntsyspc استفاده شد. دندروگرام مربوط به جدایه‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپ با استفاده از ضریب شباهت جاکارد (j) رسم گردید. در بررسی ارتباط بین کلاسترها از روش pair-Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) استفاده شد. امروزه استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر متداول‌تر است. زیرا خصوصیات تمامی اعضای مربوط به کلاستر را پوشش می‌دهد (۱۳). با توجه به آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی ۲۳ جدایه به دست آمده از یاسمن زمستانی، گروه‌هایی با شباهت بیش از ۸۸٪ درصد ایجاد شد. جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی شباهت چشمگیری با یکدیگر داشتند (شکل ۱).

پراکندگی جدایه‌ها، در این گروه‌ها بر اساس تنوع در تعداد اندکی خصوصیات فنوتیپی و تغذیه ای بود. در بررسی‌های فنوتیپی حداقل میزان شباهت بین افراد یک گونه ۸۰٪ در نظر گرفته می‌شود (۱۴). بنابراین نتیجه به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های مورد مطالعه در یک گونه قرار دارند. این نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی نسبتاً یکنواخت بوده و گروه بندی خاصی در آن‌ها دیده نمی‌شود.

در این مطالعه به منظور ردیابی مستقیم باکتری سودوموناس

مهم ترین مزایای این روش آن است که برای تعداد زیادی از باکتری های گرم منفی و برخی باکتری های گرم مثبت قابل اجراست، بدون آنکه هیچ گونه اطلاعی از ژنوم باکتری در دسترس باشد (۱۷). این روش برای پاتووارهای همگن مانند سودوموناس سیرینگی پاتووار گلای سینا (*P. s. pv. glycinea*) و یا کلاوی باکتر میشیگانسیس (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*) کاملاً مفید می باشد (۱۱، ۱۸ و ۱۹).

هالووی (Halloway) و همکاران در سال ۱۹۹۷ به منظور جداسازی سودوموناس سیارینگی پاتووار سیرینگی (*P. s. pv. syringae*) و سودوموناس سیارینگی پاتووار پایزی (*P. syringae pv. pisi*) از یکدیگر، دو روش آنالیز اسیدهای چرب و rep-PCR را مورد استفاده قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که به کارگیری الگوی اسیدهای چرب روش مناسبی برای جداسازی این دو پاتووار از یکدیگر نمی باشد. اما در مقابل روش rep-PCR به خوبی این دو پاتووار را از یکدیگر تفکیک و نژادهای موجود درون سودوموناس سیارینگی پاتووار پایزی را نیز از یکدیگر متمایز نمود (۱۸). علاوه بر این آنها عنوان نمودند که با روش rep-PCR می توان به طور موفقیت آمیزی پاتووارهای جدایه های استرالیایی سودوموناس سیارینگی را شناسایی نمود. آنها دریافتند که این روش می تواند به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه های سودوموناس سیارینگی پاتووار پایزی تلقی گردد (۱۸).

در این مطالعه با استفاده از آغازگر BOX، قطعاتی با اندازه تقریبی ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز تکثیر شدند (شکل ۴). نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات بین نواحی حفاظت شده، با آغازگر BOX برای بررسی تنوع اختصاصیت بالایی را نشان داد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزارهای Totalab (V1.1) و Nt-sys PC (V2.02) نشان داد که جدایه ها در سطح ۸۱٪، به چهار کلاستر تقسیم می شوند (شکل ۵). کلاستر اول شامل جدایه های یاسمن زمستانه شیراز، کلاستر دوم شامل جدایه خرزهره تهران، کلاستر سوم در برگبرنده جدایه زیتون تهران

عبارتند از تریپتوفان مونواکسیژناز که تریپتوفان را به ایندول استامید تبدیل می کند و ایندول استامید هیدرولاز که مسئول تبدیل ایندول استامید به IAA می باشد (۱۶). آنزیمی که در تبدیل IAA به IAA lysine نقش دارد (indole-۳-acetyl) - L-lysine synthetase می باشد (۱۵). ژن کدکننده تریپتوفان مونواکسیژناز (*iaaM*)، ایندول استامید هیدرولاز (*iaaH*) و IAA-lysine synthetase (*iaaL*) است. بررسی توالی ژن های *iaaH* و *iaaM* نشان داده است که این ژن ها با ژن های دیگر موجود در باکتری های مولد گال در گیاهان مانند رودوکوکوس فاسینس (*Rhodococcus fascience*) و آگروباکتریوم تومیفاسینس (*Agrobacterium tumefascience*) دارای شباهت هستند. اما هیچ نوکلئوتید مشابهی در ژن *iaaL* یافت نمی شود (۱۰). این امر نشان می دهد که آغازگر مذکور برای شناسایی سودوموناس ساواستائوی کاملاً اختصاصی است.

روش های مبتنی بر جداسازی عامل بیماری از گال های آلوده و تعیین خصوصیات بیماری زایی، بیوشیمیایی و سرولوژیکی بسیار وقت گیر و پرهزینه می باشند. اما روش تشخیص باکتری از گال با استفاده از روش PCR، روشی حساس، سریع، کم هزینه و بدون احتیاج به جداسازی عامل بیماری از می باشد. مطالعه حاضر اولین گزارش ردیابی مستقیم باکتری سودوموناس ساواستائوی از گال گیاهان آلوده در ایران است.

در پژوهش حاضر ۱۰ جدایه سودوموناس ساواستائوی، به عنوان نماینده انتخاب و به همراه دو جدایه از زیتون و خرزهره و نیز جدایه استاندارد IVIA1628.3 در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر Box مورد بررسی قرار گرفتند. rep-PCR ابزار ارزشمندی برای شناسایی و طبقه بندی باکتری ها به شمار می رود. علاوه بر این قادر به مطالعه تنوع در میان باکتری ها نیز می باشد. بررسی های مختلف مشخص نموده که روش فوق می تواند به عنوان یک تکنیک مطلوب و قابل اعتماد در بررسی تنوع درون جمعیت باکتری ها مورد استفاده قرار گیرد و این کار با تکیه بر پلی مورفیسمی است که پس از الکتروفورز در میان سویه ها مشاهده می شود (۱۷). یکی از

های غلات، دانه داران و هسته داران را از یکدیگر متمایز نمود (۲۳).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصله، به نظر می رسد که آغازگر BOX به تنهایی می تواند جدایه های مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف و میزبان های متفاوت را از یکدیگر متمایز نماید. بنابراین با روش مذکور، وجود ترجیح میزبانی نسبی در میان سویه های این باکتری مشخص می گردد. این در حالی است که آنالیز ویژگی های فنوتیپی قادر به نشان دادن این گروه بندی نمی باشد. علاوه بر این یافته های این پژوهش مشخص کرد که علیرغم شباهت های فراوانی که از لحاظ بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی میان سویه های مختلف سودوموناس ساواستائوی وجود دارد، اما تفاوت های آشکاری در انگشت نگاری ژنتیکی ناشی از آزمون rep-PCR و آغازگر BOX در میان سویه های مختلف دیده می شود.

با توجه به این نکات پیشنهاد می گردد تحقیقاتی به منظور تعیین ترادف ژن های موثر در بیماری زایی انجام گرفته و با یکدیگر مقایسه گردند. علاوه بر این ژن های تعیین کننده دامنه میزبانی (avr genes) نیز در این سویه ها بررسی شوند. تا مشخص گردد که آیا اختلافاتی که در انگشت نگاری ژنتیکی میان سویه های مختلف این باکتری مشاهده می گردد ناشی از تفاوت های موجود در این ژن هاست یا خیر.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بر اساس طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی واحد جهرم جهت تامین بخشی از هزینه ها کمال امتنان را دارند.

(oliveT) و جدایه استاندارد (IVIA1628.3) بود. به نظر می رسد جدایه ها با استفاده از آغازگر BOX بر اساس میزبان از یکدیگر قابل تفکیک هستند.

دو سویه سودوموناس سیارینگی پاتووار سیرینگی مورد مطالعه نیز، در کلاستری مجزا از جدایه های سودوموناس ساواستائوی قرار گرفتند. این نتیجه دور از انتظار نبود. زیرا مطالعات نشان داده است که با استفاده از این آزمون می توان گونه های نزدیک به یکدیگر را نیز از هم متمایز نمود (۲۰). علاوه بر این، جدایه استاندارد و جدایه زیتون با یکدیگر همولوژی کامل نشان دادند. از آنجایی که منشا جداسازی جدایه استاندارد نیز گیاه زیتون است، بنابراین به نظر می رسد که سویه های این باکتری دارای ترجیح نسبی میزبانی باشند. این نتیجه با یافته های برخی محققان دیگر نیز منطبق است.

تحقیقات لووس (Louws) و همکاران بر روی تعدادی از گونه های جنس زانوموناس (Xanthomonas) نشان داد که در صورت استفاده از روش سه گانه rep-PCR و آنالیز خطی آنها می توان این سویه ها را طبقه بندی نمود؛ به گونه ای که نتیجه حاصله با گروه بندی حاصل از هیبریداسیون DNA به طور کامل منطبق است (۱۹).

در سال ۲۰۰۸ نیز مارکوس (Marques) و همکاران (۲۰) با استفاده از روش BOX-PCR نشان دادند که می توان به این وسیله، ۹ گروه ژنومی پیشنهاد شده توسط گاردان (Gardan) و همکاران (۲۱) را از یکدیگر تشخیص داد. آن ها مشخص نمودند که نتایج حاصل از این روش به طور کامل با نتایج به دست آمده توسط گاردان (Gardan) و همکاران مطابقت دارد (۲۰).

موسیوند (Mosivand) و همکاران نیز نشان دادند که بر اساس انگشت نگاری ژنتیکی حاصل از rep-PCR می توان جدایه های Pss عامل نوار قرمز نیشکر را از جدایه های Pss مولد شانکر در هسته داران، بلایت باکتریایی گندم و لکه زاویه ای ختمی متمایز نموده و در گروه جداگانه ای قرار داد (۲۲). یافته های نجفی پور (Najafipour) و تقوی (Taghavi) نیز نشان داد که با استفاده از آغازگر BOX می توان اغلب جدایه

References

1. Surico G. Indoleacetic acid and cytokinins in the olive knot disease. An overview of their role and their genetic determinants. In: Bailey JA (ed.). Biology and molecular of plant pathogen interactions. Berlin. Springer Verlag; 1983: 780.
2. Bertolini E, Penyalver R, Garcia, Olmos A, Quesada JM, Cambra M, Lopez MM. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. J Microbiol Meth. 2003; 52(2): 261-266.
3. Marchi G, Viti C, Giovannetti L, Surico G. Spread of levan-positive population of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. Eur J Plant Pathol. 2005; 112(2): 101-112
4. Ghasemi Y, Taghavi SM. 2006. The incidence of winter jasmine bacterial gall disease in Shiraz. Proceeding of the 17th plant protecting congress. Tehran, University, Tehran, Iran. 392.
5. Ghasemi A, Salehi S, Shahriari D, Baniameri V. Occurrence of olive knot disease in Tehran. Iran J Plant Pathol. 2006; 42(3): 703-704. [In Persian].
6. Taghavi SM, Hasani S. Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* the causal agent of winter Jasmine gall in Iran. Iran Agr Res. 2012; 31(1): 39-48.
7. Fahy PC, Persly GJ. Plant Bacterial Disease: A diagnostic guide. Academic Press, Inc. New York; 1983.
8. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathology Soc. St. Paul, MN, USA; 2001.
9. Yaish MWF. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in common bean. Euphytica. 2006; 152(3): 397-404.
10. Penyalver R, Garcia A, Ferrer A, Bertolini E, Lopez MM. Detection of *Pseudomonos savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plant by enrichment and PCR. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(6): 2673-2677.
11. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution or repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acids Res. 1991. 19 (24): 6823-6831.
12. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Method Mol Cell Biol. 1994; 5: 25-40.
13. Rohlf FJ. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter software. Applied Biostatistics Inc., NY, USA; 2000, pp: 493-505.
15. Gardan L, Bollet C, Abu Ghorrah M, Grimont F, Grimont PAD. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. Nov. Int J Syst Bacteriol. 1982; 42(4): 606-612.
16. De Ley J. DNA base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. Ann Rev Phytopathol. 1968; 6: 63-90.

17. Rademaker JLW, De Bruijn FJ. Characterization & classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. P. 1-26 in: A. D. L. Akkermans; J. D. Van Elsas, and F. J. de Bruijn, Eds, Molecular Microbial Manual.1998; Chapter 3.4.3 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
18. Halloway GJ, Gilling MR, Fahy PC. Use fatty acid profiles & REP-PCR to asses the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv pisi isolated from Australia. Aust. Plant Pathol. 1997; 26 (2): 98-108.
19. Louws FJ, Fulbright DW, Stephenes CT, de Bruijn FJ. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathol. 1995; 85(5): 528-536.
20. Marques ASA, Marchaison A, Gardan L, Samson S. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* , *P. viridiflava* group. Gen Mol Biol. 2008; 31(2): 106-115.
21. Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PAD. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49(6): 469-478.
22. Mosivand M, Rahimian H, Shams-Bakhsh M. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruit and wheat. Iran J Plant Pathol. 2009; 45(2): 75-85. [In Persian].
23. Najafi Pour G, Taghavi SM. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from Different Hosts based on Pathogenicity and BOX-PCR in Iran. J Agr Sci Tech. 2011; 13: 431-442.



Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* isolated from winter jasmine, using BOX-PCR, in Shiraz

Gilda Najafipour¹, Sulmaz Hasani², Seyed Mohsen Taghavi³

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

² MS.c., Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

³ Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Winter jasmine, *Jasminum nudiflorum*, is a tree belonging to Syringa family, which is used in the urban designing. The gall disease in the tree branches caused by *Pseudomonas savastanoi* is one of the most important diseases in this trees. The purpose of this study was to determine the phenotypic and genotypic diversity of *P. savastanoi* using the BOX-PCR.

Materials and Methods: This experimental study was performed on 23 *P. savastanoi* isolated from winter Jasmine, Shiraz, Fars, Iran. A IAAL primer and PCR approach was used to direct tracking of the strains. The genotypic characteristics of the *P. savastanoi* isolates was performed by rep-PCR using BOX primers. The data were next analysed using NTsys-PC software.

Results: Base in numerical analysis of phenotypic characteristics, the strains showed 88% similarity to each other. Using IAAL primer and GES buffer obtained from gall extract, DNA fragments with 454 bp length were amplified. Using rep-PCR option and BOX primer in NTsys-pc software, it was shown that the isolates can be divided into three cluster with 81% similarity. These clusters belonged to Shiraz's Winter Jasmine isolates, Tehran's Oleander isolate and Tehran's Olive as well as standard isolate.

Conclusion: On the basis of our findings, using BOX-PCR it is possible to differentiate the *P. savastanoi* isolated from different geographical areas and different hosts. Furthermore, this is the first report of direct detection of *P. savastanoi* from gall using PCR in Iran.

Keywords: Winter Jasmine, BOX-PCR, *Pseudomonas savastanoi*.

Correspondence to: Gilda Najafipour

Tel: +989173089435

E-mail: gilda_najafi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(1): 6-17.