



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱

doi 10.22055/ppr.2022.17435

شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های بیماری‌زای سودوموناس جدا شده از میزبان‌های فلفل، پیاز و سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی

شیلان ارشد^۱، سویل نعمت‌اللهی^{۲*}، کیومرث روح‌رضی^۲ و نبی خضری‌نژاد^۳

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
- ۲- * نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران (Nematollahi2001@yahoo.com)
- ۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۱

چکیده

بیماری پوسیدگی باکتریایی فلفل، پیاز و سیب‌زمینی یکی از بیماری‌های مهم در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی است، که شناسایی دقیق عوامل این بیماری و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در پیشگیری از وقوع این بیماری‌ها مفید باشد. در تحقیق حاضر سعی می‌شود علاوه بر مطالعه و شناسایی فنوتیپی-بیوشیمیایی و مولکولی، به مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های باکتریایی از این میزبان‌های منتخب در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی پرداخته شود تا اطلاعات کاملی در این خصوص حاصل گردد. بدین منظور در فصول بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ نمونه‌برداری از گیاهان مزبور صورت گرفت. از کشت نمونه‌های جمع‌آوری شده، در کل ۵۹ جدایه به عنوان باکتری‌های بیماری‌زا جداسازی شدند. براساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی، همه استرین‌ها گرم منفی و کاتالاز مثبت و هوازی اجباری بوده و تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کشت KB کردند و به عنوان جنس سودوموناس شناسایی شدند. بیماری‌زایی استرین‌ها پس از گذشت دو هفته روی میزبان سالم، اثبات گردید. تنوع استرین‌ها با مقایسه ویژگی‌های فنوتیپی، انگشت‌نگاری ژنتیکی حاصل از BOX-PCR و ERIC-PCR با یکدیگر ارزیابی گردید. براساس انگشت‌نگاری ژنتیکی حاصل از این دو روش، استرین‌های سیب‌زمینی به ۵ گروه و استرین‌های جدا شده از پیاز و فلفل به ۴ گروه تقسیم شدند. این نتایج نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا بین استرین‌ها بود. براساس توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA، *gyrB* و *spoD* استرین‌های جدا شده از میزبان‌های سیب‌زمینی، پیاز و فلفل به عنوان گونه *Pseudomonas marginalis* شناسایی شدند. با بررسی منابع موجود، تحقیق حاضر اولین گزارش از جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی این استرین‌ها از میزبان‌های فلفل، سیب‌زمینی و پیاز در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: پوسیدگی باکتریایی، ویژگی‌های فنوتیپی، انگشت‌نگاری ژنتیکی، تنوع ژنتیکی

دبیر تخصصی: دکتر میلاد آئینی

Citation: Arshad, S., Nematollahi, S., Rouhrazi, K. & Kezrinejhad, N. (2022). Identifying and studying the genetic diversity of pathogenic *Pseudomonas* strains isolated from pepper, onion, and potato in east and west Azerbaijan provinces. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2), 63-83. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17435>.

مقدمه

گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) پس از چغندر قند دارای بیشترین مقدار انرژی و عملکرد ماده خشک در واحد سطح بوده و از نظر میزان انرژی و ارزش غذایی چهارمین محصول بوده و دارای تولید بسیار بالایی است (Tareke et al., 2002). مناطق عمده کشت سیب زمینی در ایران شامل اردبیل، تبریز، شاهرود، دماوند، همدان و مشهد که حدود ۸۰ درصد از محصول کشور در این مناطق تولید می شود (Ahmadi et al., 2019). پیاز با نام علمی *Allium cepa* از قدیمی ترین سبزی ها و صیفی جات خوراکی در دنیا و ایران است. از مناطق مهم پیاز کاری در ایران شهرستان های آذربایجان، ممقان، مراغه، عجب شیر و مهاباد در استان های آذربایجان شرقی و غربی می باشد (Ahmadi et al., 2019). جنس فلفل *Capsicum* دارای ۵ گونه است که بیشتر ارقام فلفل خوراکی جزء گونه های *C. frutescens* و *C. annuum* می باشند. در حال حاضر انواع مختلفی از این گیاه چه به صورت گلخانه ای و چه مزرعه ای در اکثر شهرهای استان های آذربایجان شرقی و غربی کشت می شود (Ahmadi et al., 2019).

گونه های مختلف جنس *Pseudomonas* دامنه وسیعی از ترکیبات متابولیکی را تولید می کنند. برخی از گونه ها بیمارگر، برخی به عنوان تنظیم کننده رشد گیاه ($PGPR^1$) و برخی نیز کنترل کننده بیماری های خاک زاد هستند (Nordstedt et al., 2020). این جنس دارای بیش از ۱۰۰ گونه و پاتوار می باشد که برخی ساپروفیت بوده، ولی تعداد زیادی از آن ها روی گیاهان، بیماری ایجاد می کنند (Palleroni, 2010). روش های معمول آزمایشگاهی تشخیص گونه های سودوموناس بر مبنای روش های فنوتیپی-بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استوار است (Marcelletti & Scortichini, 2014).

گروهی از محققین در کشور چین برای اولین بار باکتری عامل پوسیدگی نرم را گونه *P. marginalis* معرفی کردند (Jinhua et al., 2007). در کشور مراکش نیز عامل بیماری پوسیدگی نرم پیاز، با استفاده از آزمون های $LOPAT^2$ (تولید لوان، آزمون اکسیداز، لهایندن ورقه های سیب زمینی، آرژنین دهیدرولاز و فوق حساسیت روی شمع دانی) و همچنین استفاده از منابع کربنی، *P. marginalis* شناسایی شد (Achbani et al., 2014). اخیراً ۲۷ جدایه سودوموناس بدست آمده از میزبان های مختلف را براساس خصوصیات مورفولوژیکی، بیماری زایی و فیزیولوژیکی در کشور مونتنگرو جداسازی و شناسایی شدند (Popovic et al., 2021).

در ایران، پوسیدگی نرم غده و ساقه سیب زمینی از استان های اصفهان، تهران، خراسان، همدان، مازندران، اردبیل و آذربایجان شرقی با عوامل *P. carotovorum subsp. carotovorum* و *P. atrosepticum* گزارش شده است (Danesh & Bahar, 1984; Baghaee-Ravari et al., 2010; Dahaghin & Shamsbakhsh, 2014). همچنین گونه *Pseudomonas marginalis* از گونه های مختلف گیاهان زراعی در شرایط مزرعه و گلخانه از جمله خانواده کدوئیان مثل کدو، خیار و طالبی جداسازی و شناسایی شده اند (Ghobakhloo et al., 2002). اکرمی پور (Akramipour, 2013) سی و پنج جدایه باکتری از گیاهان سیب زمینی، کلم، چغندر قند، فلفل، هویج، پیاز، خیار، نخل، شلغم و گوجه فرنگی که علائم پوسیدگی نرم را نشان می دادند، از مناطق مختلف استان فارس جمع آوری کردند. بر اساس بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه ها در سه گروه قرار داده شدند، جدایه های گروه اول به

2- Levan, Oxidase, Potato rot, Arginine dihydrolase, Tobacco hypersensitivity

1- Plant Growth -Promoting Rhizobacteria

می‌باشند (Versalovic et al., 1991). از این توالی‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود.

در ایران محققینی به شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های سودوموناس عامل شانکر در درختان زردآلو، بادهم و هلو در استان‌های اردبیل، مازندران و گیلان با استفاده از روش BOX-PCR پرداخته و خصوصیات آن را تعیین کردند، که نتایج نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین استرین‌ها بود (Abbasi et al., 2013). Keshtkar et al. (2016) جدایه‌های سودوموناس بدست آمده از لکه برگی گردو در استان همدان را با استفاده از سه روش BOX-PCR، ERIC-PCR و REP-PCR بررسی کردند که نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که استرین‌ها از الگوی ژنتیکی یکسانی برخوردار هستند و تنوع آنچنانی بین خود ندارد. Nosratnezhad and Rouhrazi (2018) ۳۳ استرین سودوموناس بدست آمده از میزبان‌های هلو، آلبالو، آلو و گیلاس در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی را با روش‌های rep-PCR مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین استرین‌های سودوموناس داشت.

با بررسی منابع و توضیحات ارائه شده تاکنون مطالعات کمی روی تنوع و شباهت ژنتیکی جدایه‌های مختلف سودوموناس در میزبان‌های سیب‌زمینی، فلفل و پیاز در ایران و مخصوصا استان‌های آذربایجان شرقی و غربی صورت گرفته است بنابراین هدف از تحقیق حاضر شناسایی عامل بیماری‌های پوسیدگی نرم سیب‌زمینی، فلفل و پیاز با استفاده از خصوصیات فنوتیپی و توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA، *recA* و *gyrB* در استرین‌های جداشده و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌ها با استفاده از روش‌های BOX-PCR و ERIC-PCR می‌باشد.

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* جدایه‌های گروه دوم به *Pectobacterium betavasculorum* و جدایه‌های گروه سوم به *Pseudomonas* sp. شباهت داشتند.

Amanifar (2019) تعداد ۲۴۳ نمونه از گیاهان زراعی و گلخانه‌ای با علائم لکه‌های نکروتیک، سوختگی حاشیه برگ، پوسیدگی میوه و پژمردگی را از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری را جمع‌آوری کرد، که فراوانی باکتری‌های فلورسنت بیشتر از سایر جنس‌ها بود. ۵/۵۳ درصد استرین‌ها به *Pseudomonas marginalis* و ۲/۱۸ درصد به *P. syringae* pv. *syringae* تعلق داشتند. جدایه‌های *P. marginalis* از خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل، گندم، چغندر قند و دیفن باخیا و جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* از خیار، چغندر قند، گندم و گوجه‌فرنگی جداسازی و شناسایی شدند. (Emami et al., 2019) ۱۲۰ استرین باکتریایی را از میزبان‌های بادمجان، ذرت، برگ قاشقی، ذرت شیرین و گوجه‌فرنگی با علائم پوسیدگی نرم، از شهرهای مختلف استان خوزستان جداسازی کردند و براساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، باکتری‌های جداسازی شده به عنوان گونه‌های *P. putida*، *P. mosselii* و *P. etomophila aeruginosa* شناسایی شدند.

توالی‌های تکرار شونده در طول ژنوم چندین مرتبه تکرار شده و به صورت چند نسخه در ژنوم بیشتر باکتری‌های گرم مثبت یا منفی دیده می‌شوند. این توالی‌های تکرار شونده معمولا به سه شکل مشاهده می‌شوند که این سه شکل از توالی‌های تکراری که با جزئیات بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند شامل توالی‌های خارج ژنی پالیندرومی (REP^۱)، توالی‌های تکرار شونده بین ژنی انتروباکتریایی (ERIC^۲) و توالی‌های BOX

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

در این تحقیق از نمونه‌های پیاز، سیب‌زمینی و فلفل دارای علائم پوسیدگی از برخی مناطق استان‌های آذربایجان شرقی و غربی نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل شد، نمونه‌ها با آب معمولی و همچنین آب مقطر استریل شسته شده و پس از ضدعفونی با هیوکلریت سدیم ۱۰ درصد (۹۰ درصد آب مقطر استریل + ۱۰ درصد هیوکلریت سدیم) بمدت ۳۰ ثانیه، نمونه‌هایی از مرز بافت سالم و آلوده برداشته شده و داخل چند قطره آب مقطر استریل خرد شده و پس از گذشت چند دقیقه روی محیط کشت آگار مغذی کشت شد و سپس در دمای مناسب حدود ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس جهت رشد باکتری در شرایط مناسب به مدت دو الی سه روز درون انکوباتور نگهداری گردید (Schaad et al., 2001). پس از گذشت چند روز، از هر تشتک پتری تک کلونی‌های باکتریایی (استرین) انتخاب و به پتری دیش‌های جدید منتقل گردیدند. جهت اطمینان از خالص‌سازی، باکتری‌ها دوباره به صورت مخطط کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از هر پتری دیش یک کلونی برداشته و به صورت چمنی در محیط کشت جدید کشت داده شد. در این مرحله باکتری خالص شده و برای انجام بررسی‌های بعدی نگهداری شد (Schaad et al., 2001).

آزمون بیماری‌زایی

برای انجام آزمون بیماری‌زایی، میزبان‌های سالم سیب‌زمینی، پیاز و فلفل پس از شستشو با آب مقطر سترون، سوسپانسیون با باکتری‌های جداسده به میزان یک میلی‌لیتر در آب مقطر استریل تهیه کرده (در طول موج ۶۰۰ نانومتر با $OD=0.1$) و در محیط آزمایشگاهی به میزبان تزریق شد (بیماری‌زایی فلفل در شرایط گلخانه‌ای صورت گرفت). در نمونه شاهد نیز به جای باکتری، آب مقطر استریل تزریق گردید، سپس نمونه‌ها در

محیط استریل به مدت یک هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Schaad et al., 2001).

آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای برای شناسایی استرین‌ها

آزمون‌های گرم، رشد هوازی و بی‌هوازی به روش هیو و لایفسن، استفاده از مالونات و سترات به روش لیفسن و سیمونز، تحمل نمک، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، کاتالاز، آزمون LOPAT و استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط پایه آیر و همکاران و به روش شاد انجام شد (Schaad et al., 2001).

آزمون‌های مولکولی

جداسازی DNA ژنومی و الکتروفورز

جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لایز قلیایی انجام شد (Ausuble et al., 1992). استرین‌ها پس از دو روز رشد در محیط NA در دمای ۲۸-۲۵ سلسیوس، در آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآمدند. کدوری سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲ واحد تنظیم و به آن‌ها ۰/۱ حجم هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه در آب جوش قرار داده شدند، شفاف شدن سوسپانسیون به عنوان لایز شدن سلول‌های باکتریایی تلقی گردید، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه ساترifiوژ شد، سپس لایه رویی از ویال‌ها برداشته شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. از این نمونه‌ها به عنوان DNA الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس استفاده شد (Rouhrazi & Rahimina, 2012). الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۰.۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام شد. عکس‌برداری زیر نور ماورای بنفش (UV) با دستگاه ژل داکيومنت^۱ انجام شد. وجود یک باند با وزن مولکولی بالا و بدون کشیدگی در

3') برای ژن *ropD* و آغازگرهای 5'-UP-IE (CAGGAAACAGCTATGACCAGGGGGAAT-3') / M13-R (5'- CAGGAAACAGCTATGACC -3') برای ژن *gyrB* و با چرخه‌های زمانی و دمایی، ۳ دقیقه در ۹۴°C، سپس ۳۵ چرخه ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال در ۶۰°C، ۴۵°C و ۵۲°C به ترتیب برای ژن‌های 16S rRNA، *rpoD* و *gyrB* به مدت ۶۰ ثانیه، دمای گسترش در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی رشته‌های DNA به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C (Weisburg et al., 1991; Yamamoto et al., 2000) تکثیر و پس از الکتروفورز و حصول اطمینان از وجود باند مورد نظر برای هر یک از ژن‌ها، به منظور بررسی روابط فیلوژنی، محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند.

پردازش داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

توالی‌های نوکلوتیدی به دست آمده از ژن‌های 16S *rpoD*، *gyrB* و *rRNA* پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه با برنامه Clustal W با سایر توالی‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌های موجود در GenBank مقایسه شدند. درخت فیلوژنی استرین‌ها، هم به صورت تکی و هم به صورت ترکیبی (چند ژنی)، با روش اتصال همسایه‌ای (Saitou & Nei, 1987) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و با bootstrap ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید (Tamura et al., 2013).

نتایج

از کشت نمونه‌های جمع‌آوری شده از میزبان‌های منتخب در برخی مزارع استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، ۸۶ جدایه جداسازی شد که پس از بررسی‌های خصوصیات کلونی در محیط کشت (رنگ و شکل) و همچنین آزمون بیماری‌زایی در کل ۵۹ استرین به عنوان

طول ژل به عنوان معیاری مناسب جهت انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز تلقی شد (Weisburg et al., 1991).

انگشت‌نگاری ژنومی با روش ERIC-PCR و BOX-PCR

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و انگشت‌نگاری ژنومی، DNA استرین‌ها با آغازگرهای ERIC (5'- (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' / (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' و BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') با چرخه‌های زمانی و دمایی، ۳ دقیقه در ۹۴°C، سپس ۳۵ چرخه ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال در ۵۰°C و ۵۲°C به ترتیب برای BOX و ERIC به مدت ۶۰ ثانیه، دمای گسترش در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی رشته‌های DNA به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C (Versalovic et al., 1994) در دستگاه پی‌سی آر مدل Persian (EM9232) تکثیر شد.

آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

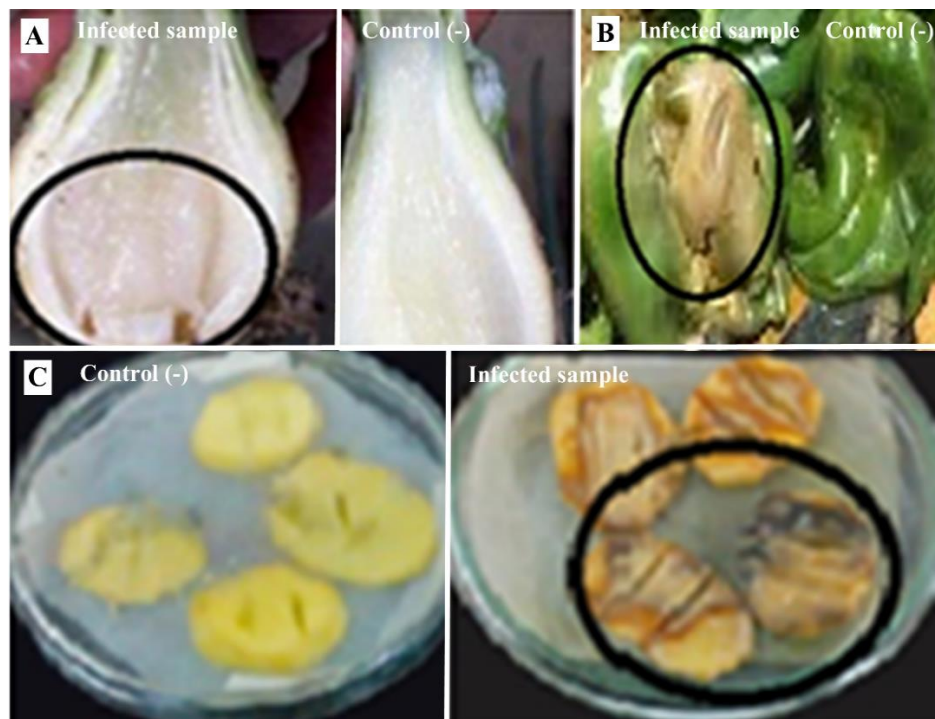
بعد از انگشت‌نگاری ژنومی با روش BOX-PCR و ERIC-PCR گروه‌بندی جدایه‌ها با مقایسه نقوش قطعات DNA در ژل و نمره‌دهی بر پایه وجود یا عدم وجود قطعات همسان و تعیین ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت. دندوگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی‌وزن و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02 ترسیم گردید (Rohlf, 1993).

تکثیر ژن‌های 16S rRNA، *rpoD* و *gyrB*

نماینده استرین‌ها به ترتیب با استفاده از آغازگرهای rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC- 3') / fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') برای ژن 16S rRNA، 70F (5'- ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATG-3') / 70Fs (5'- ACGACTGACCCGGTACGCATGTA-

ضد عفونی و شستشو با آب مقطر استریل، تزریق شد) و پس از گذشت یک الی دو هفته علائمی مشابه علائم اولیه بیماری ایجاد کردند (شکل ۱).

باکتری‌های بیماری‌زا جداسازی شدند (جدول ۱). در آزمون بیماری‌زایی باکتری‌های جداسازی شده به میزبان‌های خود (که بدون علائم و سالم بودند، پس از



شکل ۱- آزمون بیماری‌زایی باکتری‌های جداسازی شده در تحقیق حاضر روی میزبان‌های A: پیاز، B: فلفل C: سیب‌زمینی و ظهور علائم پس از یک الی دو هفته در مقایسه با شاهد منفی

Figure 1. Pathogenicity test of isolated bacteria in the present study on hosts A: onion, B: pepper C: potato and the appearance of symptoms after one to two weeks compared to the control host

جدول ۱- نام استرین‌ها، میزبان‌ها، محل جداسازی و سال جداسازی هر یک از استرین‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر

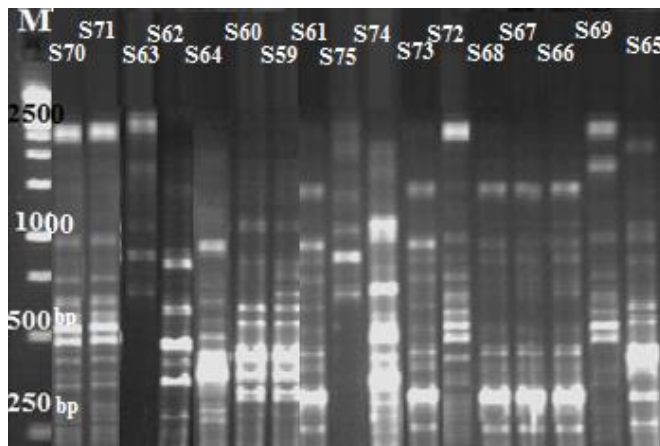
Table 1. Names of strains, hosts, isolated area and year of separation of each of the strains used in the present study

Isolates	Host	Isolated area	Year of separation
S39,S40,S41,S42,S43	Onion	Maragheh-East Azarbayjan	2019
S44,S45,S46,S47,S48,S49	Onion	Azarshahr-East Azarbayjan	2020
S50,S51	Onion	Azabshir-East Azarbayjan	2019
S52,S53,S54,S55	Onion	Mamaghan-East Azarbayjan	2019
S56,S57,S58	Onion	Bukan-West Azarbayjan	2020
S59,S60,S61	Potato	Hashtrood-East Azarbayjan	2020
S62,S63,S64,S65	Potato	Ourmieh-West Azarbayjan	2019
S66,S67,S68,S69,S70,S71	Potato	Azabshir-East Azarbayjan	2020
S72,S73,S74,S75	Potato	Naghadeh-Wet Azarbayjan	2019
S76,S77,S78,S79,S80,S81	Pepper	Mahabad-West Azarbayjan	2020
S82,S83,S84,S85	Pepper	Bukan-West Azarbayjan	2019
S86,S87,S88,S89	Pepper	Bonab-East Azarbayjan	2019
S90,S91,S92,S93,S94,S95,S96,S97	Pepper	Hashtrood-East Azarbayjan	2019

اساس تعداد باندهای تکثیر شده برای استرین‌های سیب‌زمینی به کمک آغازگر BOX، ۱۰ تا ۱۵ باند و محدوده اندازه باندها بین ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت نوکلئید بود (شکل ۲). همچنین در ERIC-PCR این استرین‌ها تولید ۹ تا ۱۴ باند که محدوده اندازه باندها نیز بین ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت نوکلئید بودند (شکل ۳).

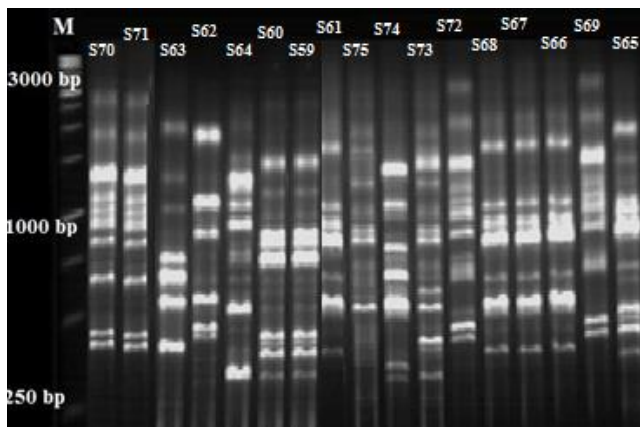
انگشت‌نگاری DNA ژنومی با روش ERIC-PCR و BOX-PCR

پس از تکثیر DNA ژنومی استرین‌های سیب‌زمینی با کمک پرایمرهای rep-PCR محصولات واکنش‌ها روی ژل آگارز الگوهای باندهای ERIC و BOX متفاوتی ایجاد کردند. بر این



شکل ۲- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین‌های سیب‌زمینی با BOX-PCR در ژل آگارز ۲ درصد. (مشخصات استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشانگر جرم مولکولی 1kb-(promega)

Figure 2. Genomic fingerprints of potato isolates generated by BOX-PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)



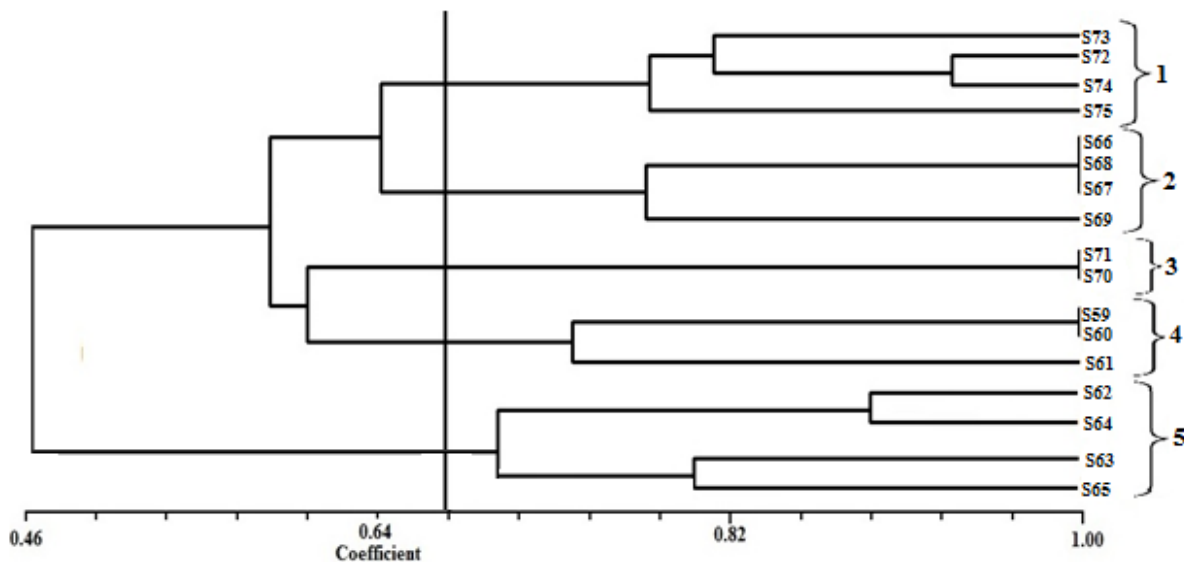
شکل ۳- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین‌های سیب‌زمینی با ERIC-PCR در ژل آگارز ۲ درصد. (مشخصات استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشانگر جرم مولکولی 1kb-(promega)

Figure 3. Genomic fingerprints of potato isolates generated by ERIC-PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)

چندگانه، شاخص مارکر و قدرت تفکیک با آغازگر BOX برای استرین‌های سیب‌زمینی، به ترتیب ۵۲/۷، ۰/۷۱، ۳۳، ۲۰/۲۳ و ۸/۲۱ به دست آمد در حالی که برای آغازگر ERIC این اطلاعات به ترتیب ۴۶، ۰/۷، ۲۴/۱۹، ۱۵/۲، ۷/۱۱ حساب شدند.

در بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های پیاز، آغازگر BOX تعداد ۱۳ تا ۱۸ باند تولید کرد که اندازه قطعات به دست آمده از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت نوکلوتید متغیر بود (شکل ۵). آغازگرهای ERIC تعداد ۴ تا ۱۲ باند تولید کردند که اندازه قطعات به دست آمده از ۱۰۰ الی ۲۵۰۰ جفت نوکلوتید متغیر بود (شکل ۶). درصد چندشکلی، میزان اطلاعات چندشکلی، ضریب موثر چندگانه، شاخص مارکر و قدرت تفکیک با آغازگر BOX برای این استرین‌ها، به ترتیب ۵۱/۳۲، ۰/۶۸، ۴۸/۳۸، ۳۴/۱۱ و ۷/۱۸ به دست آمد در حالی که برای آغازگر ERIC این اطلاعات به ترتیب ۴۱/۱۱، ۰/۵۸، ۲۹/۱۱، ۱۶/۲، ۶/۱۷ حساب شدند.

آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده با آغازگرهای BOX و ERIC نشان داد که در سطح تشابه ۶۷ درصد، استرین‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند که در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. در گروه ۱، چهار استرین (S72، S73، S74، S75) که از منطقه نقده در استان آذربایجان غربی جدا شده بودند قرار گرفتند، گروه ۲، شامل چهار استرین است (S66، S67، S68، S69) که از شهرستان عجب‌شیر به دست آمدند، در گروه ۳، دو استرین قرار گرفتند (S70، S71) که مانند گروه قبلی از شهرستان عجب‌شیر در استان آذربایجان شرقی جدا شدند. گروه ۴ و ۵ به ترتیب شامل سه و چهار استرین بودند که از شهرستان‌های هشترود و ارومیه جداسازی شدند. نتایج نشان می‌دهد که این گروه‌بندی و مناطق جغرافیایی که استرین‌ها از آن‌ها بدست آمده کاملاً مرتبط هستند به طوری که استرین‌هایی که از یک منطقه جغرافیایی جدا شدند در یک گروه قرار گرفتند. درصد چندشکلی، میزان اطلاعات چندشکلی، ضریب موثر



شکل ۴- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی استرین‌های سیب‌زمینی، حاصل از تلفیق الگوهای باندهای آغازگرهای BOX و ERIC براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

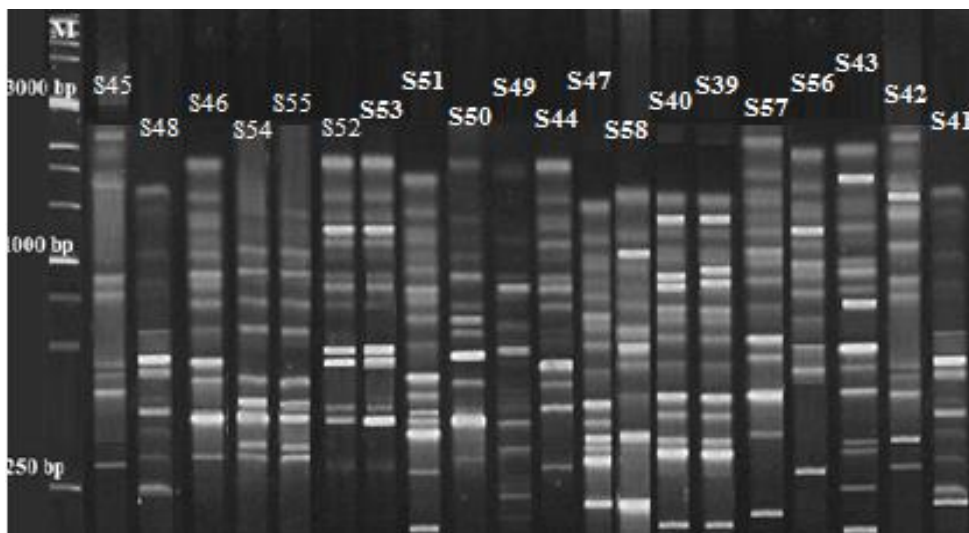
Figure 4. Dendrogram based on combined BOX and ERIC amplification patterns of potato strains, using UPGMA analysis and Jaccard's coefficient

DNA این استرین‌ها با استفاده از آغازگرهای BOX و ERIC به ترتیب در شکل‌های ۸ و ۹ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای به دست آمده از مجموع آغازگرها در سطح تشابه ۷۸ درصد استرین‌ها را به ۴ گروه تقسیم نمود (شکل ۱۰). در گروه یک، ۲ استرین (S76, S77) قرار گرفتند که از شهرستان مهاباد جداسازی شدند. گروه ۲ و ۳ به ترتیب شامل ۳ و ۸ استرین از شهرستان‌های بناب، مهاباد، بوکان و هشترود بودند. گروه ۴ نیز در برگیرنده ۹ استرین بود که از مناطق بوکان، بناب و هشترود جداسازی شدند. این نتایج نشان داد که گروه‌بندی استرین‌های به دست آمده از فلفل بر اساس BOX و ERIC ارتباطی به منشا منطقه جغرافیایی آن‌ها ندارد.

درصد چندشکلی، میزان اطلاعات چندشکلی، ضریب موثر چندگانه، شاخص مارکر و قدرت تفکیک با آغازگر BOX برای استرین‌های فلفل، به ترتیب ۴۰/۱۳، ۰/۵۷، ۲۱/۴۱، ۱۶/۱۱ و ۶/۵ بدست آمد در حالیکه برای آغازگر ERIC این اطلاعات به ترتیب ۵۴/۱۹، ۰/۶۳، ۴۶/۷۱ و ۳۳/۶۲ حساب شدند.

آنالیز خوشه‌ای نتایج بدست آمده با آغازگرهای BOX و ERIC نشان داد که در سطح تشابه ۸۰ درصد، استرین‌های پیاز به ۴ گروه تقسیم شدند که در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. در گروه ۱، شش استرین S50, S51, S52, S53, S54, S55 قرار گرفتند که از شهرستان‌های عجب‌شیر و ممقان (استان آذربایجان شرقی) جدا شدند. استرین‌هایی که از شهرستان مراغه جداسازی شده بودند در گروه دو قرار گرفتند. استرین‌هایی که از شهرستان بوکان به دست آمده بودند در گروه سه جای گرفتند. در گروه چهار نیز ۶ استرینی قرار گرفتند که از شهرستان آذرشهر جداسازی شده بودند. به جز گروه یک که استرین‌ها از شهرستان‌های عجب‌شیر و ممقان جدا شدند و گروه‌بندی آن‌ها بر اساس BOX و ERIC ارتباطی به منشا منطقه جغرافیایی آن‌ها نداشت، بقیه گروه‌ها بر اساس منطقه جداسازی استرین‌ها از همدیگر قابل تفکیک بودند.

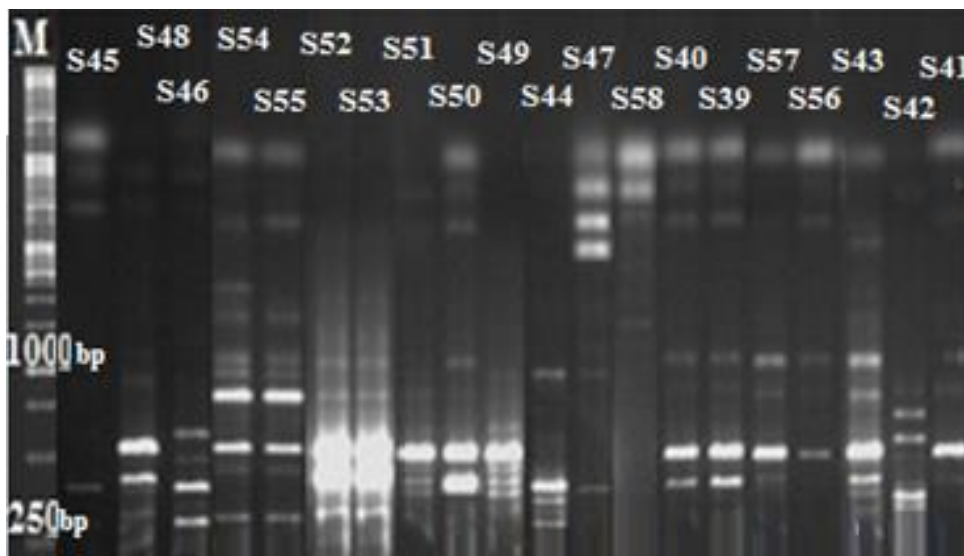
در بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های فلفل، تعداد باندهای قابل ارزیابی برای هر کدام از آغازگرهای BOX و ERIC به ترتیب ۵ تا ۱۰ و ۸ تا ۱۱ باند و اندازه‌ی آن‌ها ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ و ۱۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز بودند. الگوی انگشت‌نگاری



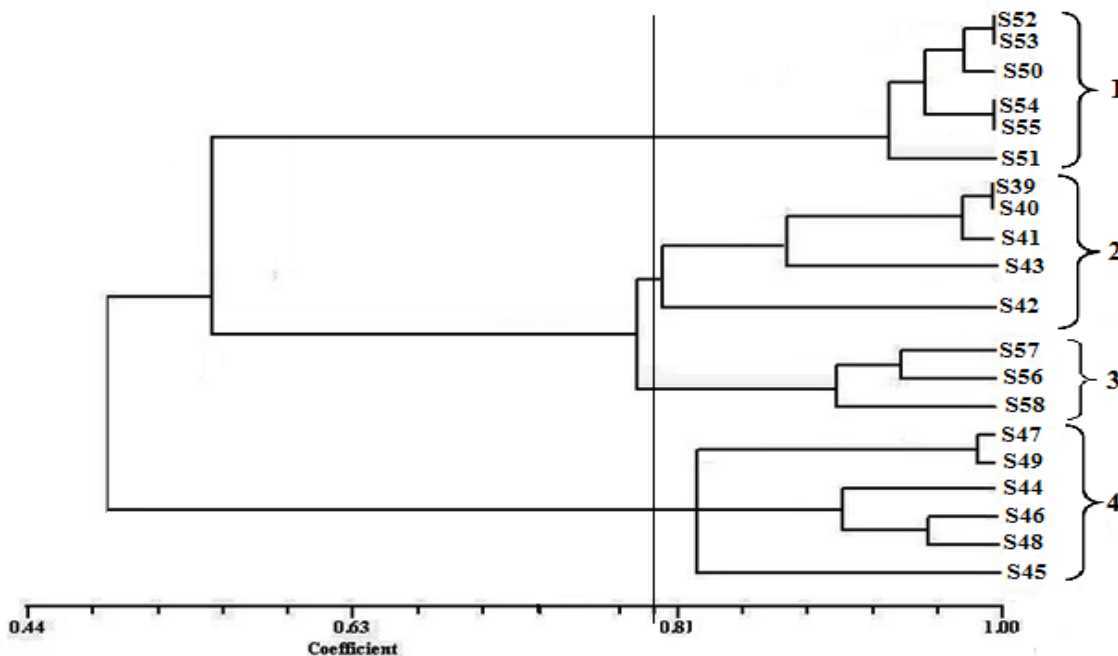
شکل ۵- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین‌های پیاز با BOX-PCR در ژل آگارز ۲ درصد.

(مشخصات استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشانگر جرم مولکولی 1kb-(promega)

Figure 5. Genomic fingerprints of onion isolates generated by BOX-PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)

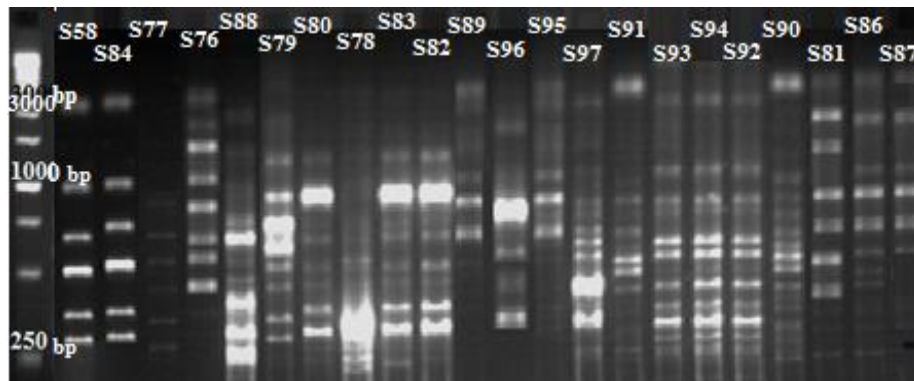


شکل ۶- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین های پیاز با ERIC- PCR در ژل آگارز ۲ درصد. (مشخصات استرین ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشانگر جرم مولکولی 1kb-(promega)
 Figure 6. Genomic fingerprints of onion isolates generated by ERIC –PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)



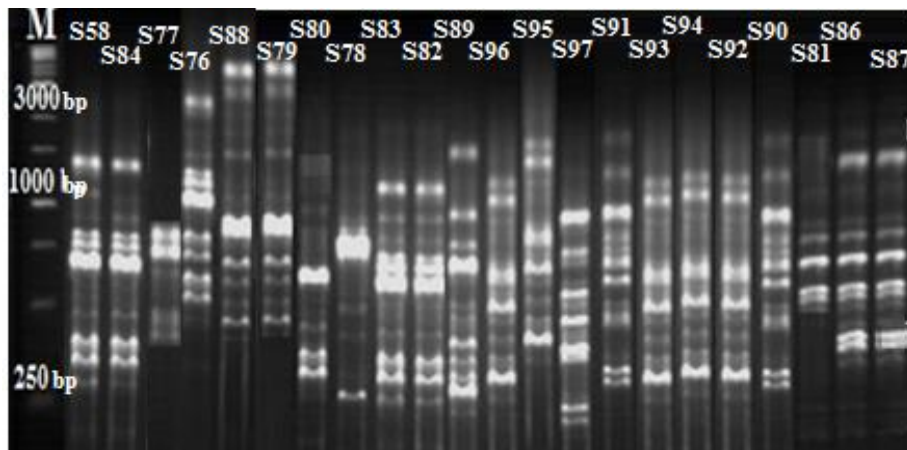
شکل ۷- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی استرین های پیاز، حاصل از تلفیق الگوهای بانندی آغازگرهای BOX و ERIC براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

Figure7. Dendrogram based on combined BOX and ERIC amplification patterns of onion strains, using UPGMA analysis and Jaccard's coefficient



شکل ۸- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین‌های فلفل با BOX-PCR در ژل آگارز ۲ درصد. (مشخصات استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشاتگر جرم مولکولی 1kb-(promega)

Figure 8. Genomic fingerprints of pepper isolates generated by BOX-PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)



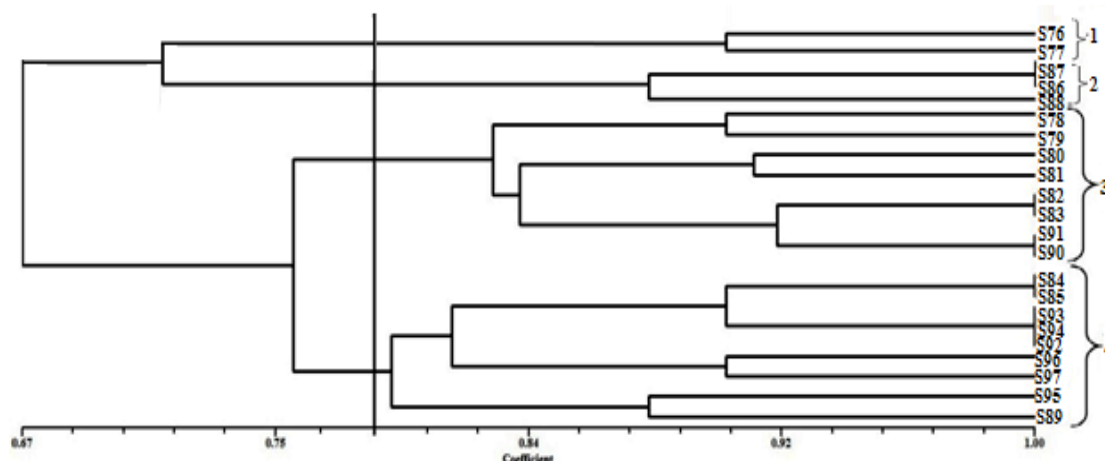
شکل ۹- الگوی قطعات حاصل از تکثیر DNA استرین‌های فلفل با ERIC-PCR در ژل آگارز ۲ درصد. (مشخصات استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است)، M: نشاتگر جرم مولکولی 1kb-(promega)

Figure 9. Genomic fingerprints of pepper isolates generated by ERIC-PCR in 2% agarose gel. (The specifications of the strains are given in Table 1). M. ladder marker 1Kb (promega)

تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های *rpoD*، *16S rRNA* و *gyrB* در استرین‌ها

پس از بررسی نتایج حاصل از خصوصیات بیوشیمیایی و فنوتیپی استرین‌ها و گروه‌بندی آن‌ها براساس BOX-PCR و ERIC-PCR، تعداد ۱۳ استرین به عنوان نماینده استرین‌ها (که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است) انتخاب شده و ژن‌های *rpoD*، *16S rRNA* و *gyrB* تکثیر شد. همه‌ی استرین‌ها به ترتیب قطعه‌ی ۱۵۰۰، ۸۹۰ و

در بررسی تنوع کلی بین جدایه‌ها، نتایج نشان داد که در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه‌ها به ۱۴ گروه تقسیم شدند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بین جدایه‌ها است همچنین ضریب همبستگی بین جدایه‌ها ۰/۹۱ بود که می‌تواند به دلیل یکسان بودن جنس و گونه‌ی باکتری عامل بیماری باشد. متفاوت بودن میزان، مناطق جداسازی باکتری و همچنین رخ دادن جهش ژنتیکی در باکتری‌های جداسازی شده می‌تواند دلیل تنوع ژنتیکی جدایه‌ها باشد.



شکل ۱۰- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی استرین‌های فلفل، حاصل از تلفیق الگوهای بانندی آغازگرهای BOX و ERIC براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

Figure 10. Dendrogram based on combined BOX and ERIC amplification patterns of pepper strains, using UPGMA analysis and Jaccard's coefficient

S84: NF569434, NF569442; S54: NF569431, NF569440; S95: NF569435, NF569443) بانک ژن ثبت شدند و در درخت فیلوژنتیکی با استرین‌های استاندارد *P. marginlais* به صورت جداگانه در یک کلاستر قرار گرفتند که نشان‌دهنده متعلق بودن استرین‌ها به این گونه بودند (شکل ۱۳).

بحث

در حال حاضر استفاده از تاکسونومی پلی‌فازی بهترین راه برای درک ارتباطات تاکسونومیک و فیلوژنتیکی باکتری‌ها است (Vandamme et al., 1996; Prakash et al., 2007; Nouioui et al., 2018). گونه‌های مختلف جنس سودوموناس مجموعه ناهمگنی را تشکیل می‌دهند که گیاهان متنوعی را آلوده می‌کنند (Abbasi et al., 2013; Keshtkar et al., 2016; Nosratnezhad & Rouhrazi, 2018). گزارش‌های متعددی از وجود گونه‌های مختلف این جنس در ایران موجود است، اما تاکنون اطلاعات جامعی در مورد جایگاه دقیق تاکسونومیک باکتری، ویژگی‌های میزبانی و صحت تشخیص و نام‌گذاری

۷۸۰ جفت بازی از ژن‌های 16S rRNA، ژن *gyrB* و ژن *rpoD* را تولید کردند (شکل ۱۱).

پس از تکثیر ژن‌های مزبور، محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید. توالی‌های 16S rRNA به دست آمده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شده و در این پایگاه با شماره‌های دسترسی (S50: NF569457; S73: NF569459; S39: NF569456; S80: NF569460; S62: NF569458; S83: NF569461; S78: NF569462) ثبت شدند. براساس درخت فیلوژنی رسم شده براساس ژن 16S rRNA با استفاده از نرم‌افزار MEGA6، استرین‌هایی که از میزبان‌های فلفل، سیب‌زمینی و پیاز جدا سازی شده بودند با استرین استاندارد *Pseudomonas marginalis* ICMP3553 در یک کلاستر قرار گرفتند (شکل ۱۲).

براساس درخت فیلوژنی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6، که از تلفیق ژن‌های *gyrB* و *rpoD* برای نماینده استرین‌ها رسم شد استرین‌های جدا شده در این تحقیق که به ترتیب برای ژن‌های *gyrB* و *rpoD* با شماره‌های دسترسی (S69: NF569433, NF569442;)

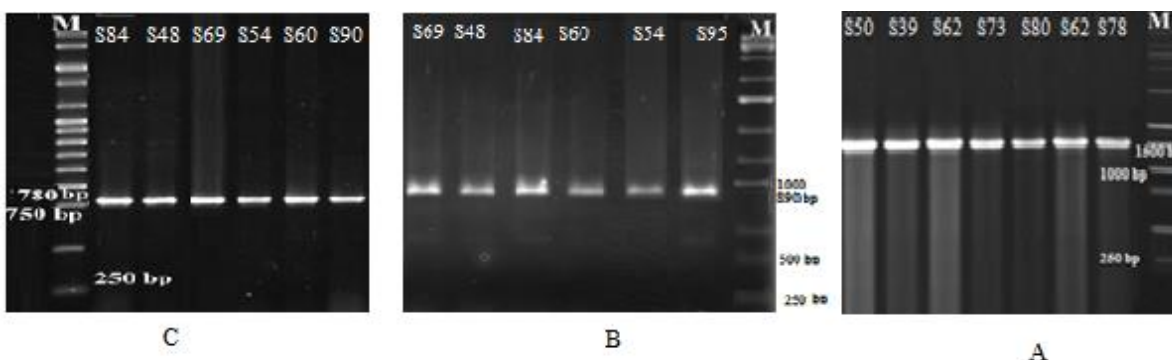
در تحقیق حاضر نشان داده شد که استفاده از خصوصیات فنوتیپی از جمله آزمون‌های فیزیولوژی و تغذیه‌ای مثل استفاده از قندها و اسیدهای آلی و آمینه مختلف به عنوان منبع کربنی و همچنین آزمون LOPAT در تفکیک و شناسایی گونه‌های سودوموناس مفید می‌باشد که این نتایج با یافته‌های (Cottyn et al., 2009; Trantas et al., 2013; Berge et al., 2018; Ruan et al., 2018) مطابقت دارد.

در سال‌های ۱۹۹۱ و ۱۹۹۴ اولین بار (Versalovic et al., 2018) طیف وسیعی از باکتری‌ها را با استفاده از آزمون rep-PCR مورد مطالعه قرار دادند و سودمند بودن این روش را در تفکیک استرین‌های درون یک گونه گزارش کردند. اطلاعات به‌دست آمده از انگشت‌نگاری با استفاده از روش rep-PCR بخصوص BOX-PCR در بررسی‌های متعددی منجر به تفکیک گروه‌های مختلف و معرفی گروه‌های غیرعادی شده که با استفاده از سایر اطلاعات امکان تشخیص فراهم نبوده است (Ferrante et al., 2015; Bilung et al., 2018). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از این تکنیک (BOX و ERIC-PCR) اقدام به گروه‌بندی استرین‌ها شد که نتایج نشان داد این روش از قدرت تفکیک خوبی در بررسی تنوع ژنتیکی برخوردار می‌باشد که با نتایج (Marques et al., 2016; Ilicic et al., 2016; Nosratnezhad & Rouhrazi, 2018) مطابقت دارد.

گونه‌ها و پاتووارها گزارش شده، وجود ندارد. عمده تحقیقات انجام شده به معرفی بیماری از یک منطقه جغرافیایی و یا میزبان‌های خاص و یا مطالعه مقدماتی فنوتیپی، سرولوژیکی و بررسی تنوع ژنتیکی برخی از دیگر گونه‌ها و پاتووارهای سودوموناس با روش‌هایی نظیر rep-PCR محدود می‌گردد (Abbasi et al., 2013; Nosratnezhad & Rouhrazi, 2018; Amanifar, 2019).

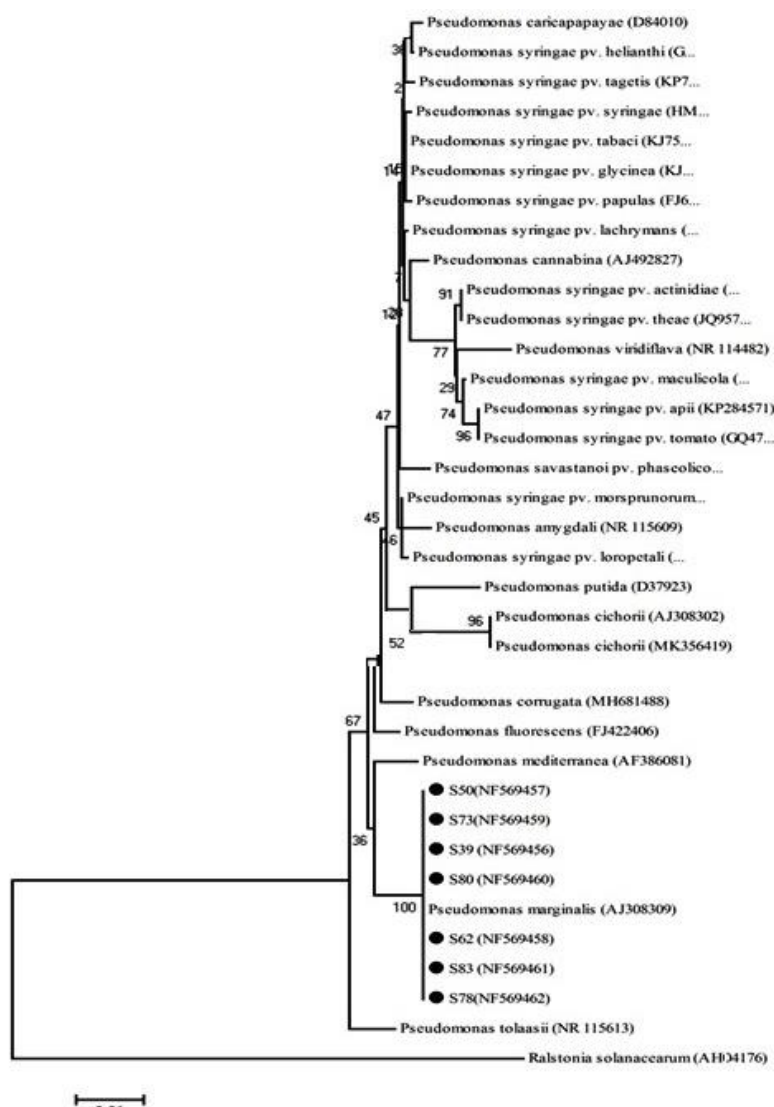
با توجه به گستردگی دامنه میزبانی، تنوع فراوان و خسارت اقتصادی این جنس، ضرورت انجام تحقیقات گسترده‌تر بر روی گونه‌ها و پاتووارهای مختلف آن احساس می‌گردد. در تحقیق اخیر تلاش گردید تا با استفاده از روش‌های پلی‌فازی جایگاه تاکسونومیک باکتری‌های جداشده از سیب‌زمینی، پیاز و فلفل مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استرین‌های یک گونه، دارای خصوصیات فنوتیپی از جمله خصوصیات فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای مشابهی نسبت به هم هستند بنابراین این خصوصیات نتوانست تنوع را به خوبی بین این استرین‌ها نشان دهد. (Dawson et al., 2012) نیز اعلام کردند که خصوصیات فنوتیپی جهت شناسایی اولیه استرین‌ها مفید هستند و نمی‌توانند به عنوان ابزاری برای بررسی تنوع بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ۱۱- تکثیر قطعات ۱۵۰۰، ۸۹۰ و ۷۸۰ جفت بازی استرین‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر به ترتیب A: ژن 16S rRNA، B: ژن *gyrB* و C: ژن *rpoD*

Figure 11. Amplification of 1500, 890 and 780 bp fragments of the strains studied in the present study: A: 16S rRNA gene, B: *gyrB* gene and C: *rpoD* gene, respectively

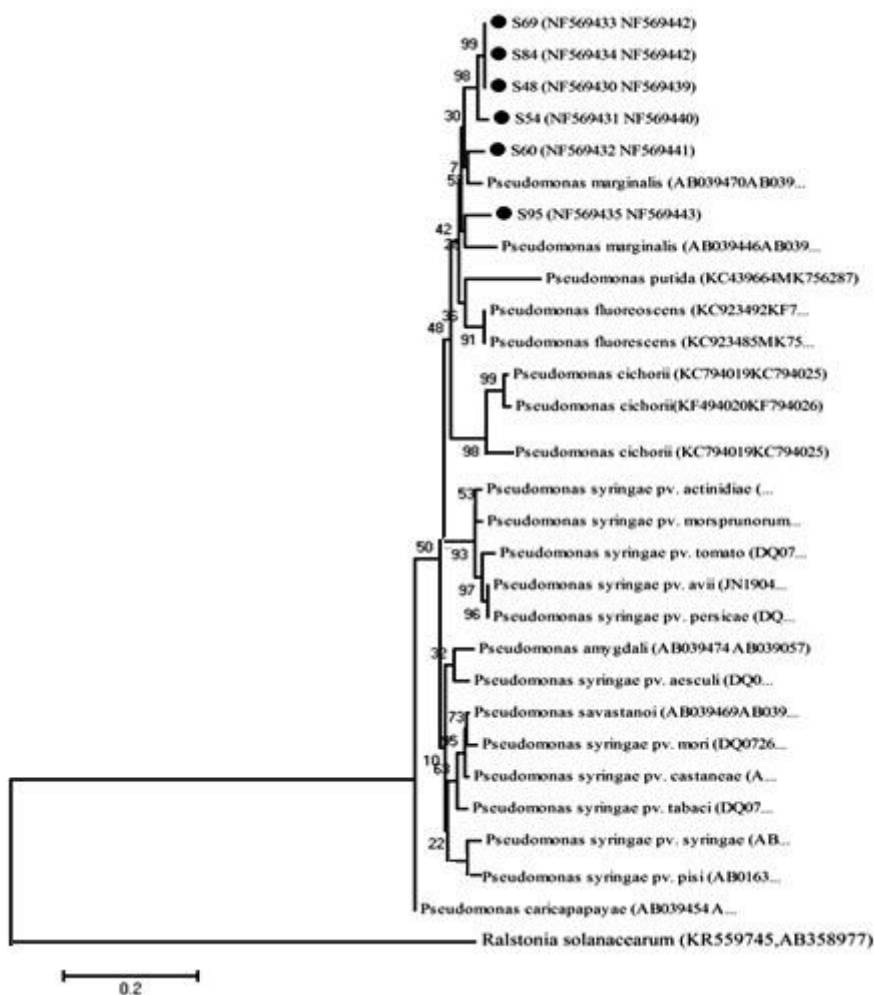


شکل ۱۲- درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه توالی ژن 16S rRNA استرین‌های جدا شده در این تحقیق با گونه‌های سودوموناس موجود در بانک ژن، رسم شده با نرم افزار MEGA6. (Out group: *Ralstonia solanacearum*)

Figure 12. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences, showing the relationships between the representative isolates and different strains of *Pseudomonas* spp. Was drawn by MEGA6. (Out group: *Ralstonia solanacearum*)

به منظور درک بهتر ارتباط میان پاتووارهای این گونه پیچیده لازم است تا علاوه بر مطالعات مذکور به بررسی ژن‌هایی پرداخت که کد کننده ویژگی‌های فنوتیپی هر باکتری هستند. در تحقیق مزبور برای درک بهتر و اثبات این فرضیه، بررسی توالی برخی از ژن‌های خانه‌داری و تلفیق اطلاعات حاصله صورت پذیرفت. براساس اطلاعات حاصل از تعیین توالی ژن 16s rDNA کلیه جدایه‌ها به جنس *Pseudomonas* تعلق داشتند. با عنایت به درجه حفاظت‌شدگی بسیار بالا در ژن‌های اپران ریپوزومی، برای تفکیک باکتری‌ها در سطح جنس تفاوت‌های اندک حائز اهمیت است. براساس تعریف‌های تاکسونومیکی این حد تفاوت تنها سه درصد در نظر گرفته می‌شود (Weisburg, 1991)

به منظور درک بهتر ارتباط میان پاتووارهای این گونه پیچیده لازم است تا علاوه بر مطالعات مذکور به بررسی ژن‌هایی پرداخت که کد کننده ویژگی‌های فنوتیپی هر باکتری هستند. در تحقیق مزبور برای درک بهتر و اثبات این فرضیه، بررسی توالی برخی از ژن‌های خانه‌داری و تلفیق اطلاعات حاصله صورت پذیرفت. براساس اطلاعات حاصل از تعیین توالی ژن



شکل ۱۳- دندروگرام حاصل از مقایسه توالی ژن های *gyrB* و *rpoD* استرین های جدا شده در این تحقیق با باکتری های موجود در بانک ژن. رسم شده با نرم افزار MEGA6. (Out group: *Ralstonia solanacearum*)

Figure 13. Phylogenetic tree based on the *gyrB* and *rpoD* sequences, showing the relationships between the representative isolates and different strains of *Pseudomonas* spp. Was drawn by MEGA6. (Out group: *Ralstonia solanacearum*)

تعداد ابران های ریبوزومی در برخی گونه های سودوموناس چهار عدد و در برخی دیگر از گونه های این جنس پنج عدد نیز گزارش شده است (Kerckhof, 1997). تفاوت در طول ژن های این ابران ممکن است به درک نادرستی از روابط فیلوژنتیکی پاتوارهای یک گونه واحد، منجر گردد. بنابراین می توان احتمال داد که استفاده از توالی ابران و به خصوص ژن 16S rDNA همواره به نتایجی کاملا

برای شناسایی باکتری ها از جمله گونه ها و پاتوارهای سودوموناس، توالی یابی ژن های نواحی ریبوزومی (16S rRNA و 23S rRNA) و همچنین نواحی بین ژنی (ITS) ابزاری کارآمد محسوب می شود که در بین این سه ناحیه، ژن 16S rRNA به دلیل حفاظت شدگی بین گونه های مختلف باکتری ها، برای مطالعات فیلوژنتیکی استفاده می شود (Weisburg, 1991).

زمینی، فلفل و پیاز جمع آوری شده یک باکتری گرم منفی جدا گردید. خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین‌ها از جمله واکنش گرم، تولید رنگدانه فلورسنت، متابولیسم گلوکز در شرایط هوازی، تولید کاتالاز و عدم نیاز به عوامل رشد با خصوصیات جنس سودوموناس مطابقت داشتند (Schaad et al., 2001, Ruan et al., 2018). بنابراین استرین‌های به دست آمده در این تحقیق متعلق به جنس سودوموناس تشخیص داده شدند و به منظور شناسایی گونه و پاتوار این جنس، آزمون‌های اصلی از جمله لوان، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، اکسیداز، آرژنین دهیدورلاز و ایجاد فوق حساسیت روی شمع‌دانی انجام شد. استرین‌های مورد مطالعه به خاطر تولید لوان و هیدرولیز آرژنین، اکسیداز و همچنین ایجاد پوسیدگی نرم روی ورقه‌های سیب‌زمینی و عدم فوق حساسیت روی شمع‌دانی به عنوان گونه *P. marginalis* ارزیابی شدند. (Jinhua et al., 2007). نیز با استفاده از روش‌های فنوتیپی و همچنین توالی یابی ژن 16S rRNA برای اولین بار این گونه را به عنوان عامل پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی در چین معرفی کردند. Amanifar (2019) نیز همین گونه را به عنوان عامل پوسیدگی سیب‌زمینی و فلفل در استان چهارمحال و بختیاری گزارش کردند (Emami et al., 2019).

گروهی از باکتری‌های سودوموناس از جمله *P. putida* و *P. auroginosa* را به عنوان باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم در چند گیاه از جمله گوجه فرنگی، بادمجان و ذرت معرفی کردند. در مطالعات دیگر در مناطق دیگر کشور گونه‌های مختلف جنس *Pectobacterium* به عنوان پوسیدگی نرم در برخی سبزیجات و گیاهان زراعی و صیفی گزارش شده است (Baghaee-Ravari et al., 2010; Akramipour, 2013; Dahaghin & Shamsbakhsh, 2014). باتوجه به بررسی منابع، به نظر می‌رسد این دو جنس مزبور عامل اصلی پوسیدگی نرم در میزبان‌های مختلف باشند.

بی نقص و تایید شده منجر نگردد. در تحقیق دیگری که روی برخی پاتوارهای سودوموناس انجام شده است، گزارش گردید که تعیین توالی بخشی از ژن 16S rRNA قابلیت تفکیک چند جدایه مورد مطالعه را ندارد و در توالی به دست آمده در سه پاتوار مورد مطالعه تنها یک نوکلوتید متفاوت مشاهده شده است (Scortichini et al., 2016). محققین دیگری نیز اشاره نمودند که به دلیل پائین بودن نرخ تکاملی، در برخی موارد این ژن توان لازم برای نمایش ارتباط میان پاتوارها را ندارد (Mulet et al., 2010). موارد مشابهی در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Rajwar & sahal, 2016). دو ژن پریان *rpoD* (به عنوان سیگما فاکتور و پروتئینی که در رونویسی نقش داشته و سبب می‌شود که RNA پلی‌مراز به درستی در مکان اولیه خود جهت آغاز رونویسی، قرار بگیرد) و *gyrB* (محصول این ژن به عنوان آنزومی در جهت باز کردن پیچیدگی دو رشته DNA موقع رونویسی و بیان، همچنین در جلوگیری از وارد شدن آسیب به کروموزم نقش دارد)، در طول خود دارای سایت‌های پلی‌مورفیک هستند. میزان حفاظت شدگی و تغییر در این ژن‌ها سبب گردیده‌است تا به عنوان ژن‌های مناسبی برای مطالعات فیلوژنتیک باشند و در میان ژن‌های دیگر، مناسب‌ترین ژن برای این گونه مطالعات تشخیص داده شوند (Yamamoto et al., 2000). لذا در تحقیق حاضر علاوه بر ژن 16S rRNA از دو ژن دیگر نیز استفاده شد تا با توالی‌یابی ژن‌های خانه داری، استرین‌های مورد مطالعه مورد شناسایی و جایگاه دقیق تاکسونومیک آن‌ها تعیین گردد.

علائم بیماری پوسیدگی نرم در مزارع و همچنین انبار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی از سال‌ها پیش وجود داشته ولی به جز جداسازی باکتری عامل به صورت پراکنده، بررسی وسیع یا مستمری روی عامل بیماری انجام نشده است. به منظور بررسی دقیق عامل بیماری و ارزیابی تنوع باکتری‌ها، باز دیده‌هایی از مناطق آلوده به عمل آمده و از نمونه‌های سب

نتایج مطالعات انجام شده در بررسی حاضر نشان می‌دهد که استرین‌های مختلف گونه *P. marginalis* به صورت ژنتیکی با یک میزبان خاص سازگار شده‌اند و تنوع در میان استرین‌های مختلف این گونه به دلیل گسترده بودن دامنه میزبانی آن به مراتب بیشتر است، که این نتایج با نتایج (Cottyn et al., 2009; Trantas et al., 2013; Marques et al., 2016; Ruan et al., 2018) مطابقت دارد. با توجه به اینکه در کشورهای دیگر و همچنین دیگر مناطق کشور گونه‌های مختلف باکتری پکتوباکتریوم به عنوان باکتری غالب در ایجاد پوسیدگی نرم گزارش شده است، در تحقیق حاضر مشاهده گردید که جمعیت باکتری *P. marginalis* در مناطق شمال غرب روی محصولات مطالعه شده رو به افزایش است که ممکن است طی چند سال آینده گونه‌ی غالب در این مناطق باشد که نیازمند اقدامات جدی در جهت کنترل و جلوگیری از پخش آن به دیگر مناطق کشور و همچنین دیگر محصولات کشاورزی می‌باشد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله از آقای دکتر غلام خداکرمیان به سبب مشاوره ایشان در انجام تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

دندوگرام ترسیم شده براساس نتایج ERIC, BOX-PCR در مورد میزبان فلفل نشان داد که استرین‌های جمع‌آوری شده از شهرهای مختلف در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند در حالی که در مورد میزبان سیب‌زمینی نتایج نشان داد که گروه‌بندی استرین‌ها ارتباطی به منطقه جغرافیایی آن‌ها ندارد. لذا نتایج نشان‌دهنده وجود تنوع درون گونه‌ای بالا در بین استرین‌های *P. marginalis* به دست آمده از میزبان‌های مختلف دارد که این نتایج با نتایج Guilbaud et al. (2016) مطابقت دارد.

یکی از دلایل تنوع بالا بین استرین‌های سیب‌زمینی، پیاز و فلفل، احتمالاً به دلیل سابقه طولانی مدت کشت این گیاهان در استان‌های یادشده باشد بطوریکه احتمالاً میکروفلور همراه، باگذشت زمان با میزبان‌های مختلف سازگار شده‌اند. دندروگرام ترسیم شده براساس ترکیب داده‌های حاصل از ERIC-PCR و BOX-PCR بهتر از دندروگرام‌های مربوط به هر یک از آن‌ها به تنهایی، ارزیابی شد. به طوری که ضریب همبستگی در دندروگرام‌های ترکیبی بیشتر از دندروگرام‌هایی بود که به صورت تکی و مجزا برای استرین‌ها رسم شد. (Girard et al. 2020) نیز پیشنهاد کردند که برای یک خوشه‌بندی باثبات و دقیق، بهتر است داده‌ها باهم ترکیب شوند.

REFERENCES

- Abbasi, V., Rahimian, H., & Tajick-Ghnbari, M. (2013). Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 225–235.
- Achbani, E. H., Sadik, S., Kahkahi, R. E., Benbouazza A., & Mazouz H. (2014). First report on *Pseudomonas marginalis* bacterium causing soft rot of onion in Morocco. *Atlas Journal of Biology*, 3, 218–23.
- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Abdshah, H., & Kazemian, A. (2019). *Agricultural Statistics of Iran in 2018-2019: Crops* (Volume 1). Ministry agriculture – Jahad Publication, Tehran. (In Farsi).

Akramipour, N. (2013). *Investigation of soft rot-causing pectobacteria from different hosts based on molecular properties*. [Master of Science Thesis]. Yasuj University. Iran. (In Farsi)

Amanifar, N. (2019). *Pseudomonas marginalis* as a potential pathogen of greenhouse grown plants and crops with sprinkler irrigation. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 55, 87-104. (In Farsi with English Abstract).

Ausuble, F., Brent, F. M., Kingstone, R. E., Moor, D. D., Smith, J. A., Seideman, J. G., & Struhl, K. (1992). *Current Protocol in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Wiley Interscience, New York. 4757 p.

Baghaee-Ravari S., Shams-Bakhsh M., Rahimian H., & Safaie N. (2010). Phenotypic and genotypic diversity of pectolytic erwinias isolated from ornamental hosts in some northern parts of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46, 61-64.

Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*, 9, e105547.

Bilung, L.M., Pui, C., F., Su 'ut, L., & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic Leptospira. *Disease Markers*, 5, 21-30.

Cottyn, B., Heylen, K., Heyrman, J., Vanhouteghem, K., Pauwelyn, E., Bleyaert, P., Van Vaerenbergh, J., Höfte, M., De Vos, P., & Maes, M. (2009). *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butter head lettuce in Flanders. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 211–225.

Dahaghin, L., & Shams-Bakhsh, M. (2014). Identification and genetic diversity of pectolytic phytopathogenic bacteria of mono and dicotyledonous ornamental plants in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96(2): 271-279.

Danesh, D., & Bahar, M. (1984). *Occurrence of bacterial wilt of potato in Iran*. In: Proceedings of the 9th triennial Conference of the European Association for Potato Research, Interlaken, CH, 407-408.

Dawson, S. L., Fry, J., & Dancer, B. N. (2012). A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent Pseudomonads. *Journal of Microbiology Methods*. 50, 9-22.

Emami, P., Mehrabi-Koushki, M., Hayati, J., & Aeni, M. (2019). Detection and identification of some Pseudomonas species causing soft Rot using TUF gene. *Biological Journal of Microorganism*, 32, 81-93.

Ferrante, P., Takikawa, Y., & Scortichini, M. (2015). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from past and current epidemics to *Actinidia* spp. reveal a diverse population structure of the pathogen. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 677–689.

Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P., & Berge, O. (2016). Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 1-7.

Girard, L., Lood, C., Rohnizadeh, H., Van Voort, N., Lavingae, R., & De Mot, R. (2020). Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the *rpoD* Gene. *Microorganisms*, 8, 1166- 1175.

Ghobakhloo, A., Shahriari, D., & Rahimian, H. (2002). Occurrence of bacterial leaf spot and blight of cucurbits in Varamin and evaluation of the resistance of some cultivars and lines of cucumber to the disease. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 38, 59–60. (In Farsi with English Abstract).

Ilicic, R., Balaz, J., Stojšin, V., & Josic, D. (2016). Characterization of *Pseudomonas syringae* pathovars from different sweet cherry cultivars by RAPD analysis. *Genetika*, 48, 285–295.

Jinhua, L., Zhaxiang, C., Guoquan, L., & Wang, D. (2007). First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. *Australasian Plant Disease Notes*, 2, 71–73.

Kerkhof, L. 1997. A ribosomal RNA operon from *Pseudomonas stutzeri* Zobell. *Gene*, 192(2): 241-243.

Keshtkar, A., Khodakaramian, G., and Rouhrazi, K. 2016. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* which induce leaf spot on walnut. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 837–846.

Marcelletti, S., & Scortichini, M. 2014. Identification of plant pathogenic *Pseudomonas* genomospecies of the *Pseudomonas syringae* complex through multiple comparative approaches. *Bacteriology*, 104, 1274-1283.

Marques, E., Borges, D. F., & Uesugi, C. (2016). Identification and pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* associated with a bacterial blight of gerbera in the Federal District. 2016. *Horticultura Brasileira*. 7, 22-31.

Mulet M., Lalucat J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12, 1513-1530.

Nordstedt, N. P., Chapin, L. J., Christopher, G., & Jones, M. L. 2020. Identification of *Pseudomonas* Spp. that increase ornamental crop quality during abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1-12.

Nosratnezhad, F., & Rouhrazi, K. (2018). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruits in north-western Iran. *Journal of Phytopathology*, 166, 516-524.

Nouioui, I., Carro, L., Marina, G., Jan P., Tanja, W., Nikos, K., Rüdiger, P., & Markus, G. (2018). Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 1-19.

Palleroni, N. j. (2010). The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*, 12, 1377–1383.

Popovic, T., Menkovic, J., Prokic, A., Zlatkovic, N., & Obradovic, A. (2021). Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* isolates affecting stone fruits and almond in Montenegro. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 21, 1-15.

Prakash, O., Verma, V., Sharma, P., Kumar, M., Kanna, M. and Lal, R. (2007). Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian Journal of Microbiology*, 42, 98-108.

Rajwar, A., & Sahgal, M. (2016). Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, *Pseudomonas*-specific and *rpoD* genes. *3 Biotech*, 6, 80-90.

Rohlf, F. J. (1993). *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.0. New York, NY: Exeter Software.

Rouhrazi, K., & Rahimian, H. (2012). Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium (Agrobacterium)* spp. *Journal of Plant Pathology*, 94, 555–560,

Ruan, H., Shi, N., Du, Y., Chen, F., Yang, X., Gan, L., & Dai, Y. (2018). First report of *Pseudomonas cichorii* causing tomato pith necrosis in Fujian Province, China. *Plant disease*, 103(1), 145.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathology Society, St. Paul, MN.

Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M. T., & Rossi, M. P. (2003). Genetic diversity, presence of the *syrB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. *Plant Pathology*, 52, 277-286.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular and Biology Evolution*, 30, 2725-2729.

Tareke, E. T., Karlsoon, P., Sune Eriksson, S., & Margareta, T. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricore and Food Chemistry*, 50, 4998-5006.

Trantas, E. A., Sarris, P. F., Mpalantinaki, E. E., Pentari, M. G., Ververidis, F., & Goumas, D. E. (2013). A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 477-493.

Vandamme, P., Pot, B., Gilis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiological reviews*, 60, 407-38.

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution or repetitive DNA- sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Research*, 19: 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology*, 5, 25-40.

Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146, 2385-2394.



© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



Identifying and studying the genetic diversity of pathogenic *Pseudomonas* strains isolated from pepper, onion, and potato in east and west Azerbaijan provinces

S. Arshad¹, S. Nematollahi^{*2}, K. Rouhrazi², N. Kezrinejad³

1. Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (Nematollahi2001@yahoo.com)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Mahabad branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran

Received: 2 November 2021

Accepted: 8 March 2022

Abstract

Background and Objectives

The bacterial rot of pepper, onion, and potato is one of the most crucial diseases in the East and West Azerbaijan provinces of Iran. Therefore, accurate identification of the causes of these diseases and the study of their genetic diversity can be beneficial in preventing their occurrence. In the present study, in addition to studying and identifying their morphological and molecular characteristics, the genetic diversity of bacterial species from selected hosts in the provinces of East and West Azerbaijan is studied to obtain comprehensive information.

Material and Methods

Infected potatoes, onions, and peppers with soft rot symptoms were collected from different areas in the East and West Azarbaijan provinces of Iran in the timeframe between 2019 and 2020. Infected samples were cultured on the NA medium. Moreover, purified bacterial colonies were streaked on the Kings'B medium. All isolates that produced fluorescent pigments were identified using biochemical, nutritional, and physiological tests, including LOPAT tests (levan production from sucrose (L), the presence of oxidase (O), the ability to cause rot on potato tubers (P), the presence of arginine dihydrolase (A), and the ability to induce hypersensitivity reaction (HR) on tobacco leaves (T)), nitrate reduction, and the utilization of various carbon sources. All isolates that produced fluorescent pigments were identified as *Pseudomonas* using phenotypic properties. To assess the genetic diversity within the strains, BOX and ERIC-PCR were analyzed. The UPGMA method was employed to evaluate the similarity matrix and clustering between the strains. For genetic identification, 16S rRNA, *gyrB*, and *ropD* genes of strains were amplified and sequenced.

Results

A total of 59 isolates were obtained from infected onion, pepper, and potato plants. The bacterial isolates revealed cream colonies with a low convex height, jagged edge, and rugged surface on the nutrient agar medium. All strains produced fluorescent pigments on the King's B medium and demonstrated Gram-negative and positive reactions to the catalase. In pathogenicity tests, all strains were pathogenic on healthy plants. Moreover, clustering ERIC and BOX-PCR results with UPGMA and Jaccard's similarity coefficients showed that the strains of potato, pepper, and onion were clustered into five and four main groups, respectively. The *gyrB*, *rpoD*, and 16S rRNA nucleotide sequences showed high similarity between the strains and *Pseudomonas cichorii*.

Discussion

The results showed that Iranian *P. marginalis* strains are very diverse and are related to the isolation site and the host plant. This high diversity can be due to the long history of cultivating these plants in the provinces of Iran and the high genetic diversity in the bacterial population. Based on previous studies published on Iranian *P. marginalis*, this is the first report of isolation and identification of *P. marginalis*, the agent that causes soft rot in pepper, onion, and potato in East and West Azarbaijan provinces.

Keywords: *Bacterial rot, Phenotypic properties, Genetic fingerprinting, Genetic diversity*

Associate editor: M. Aeini (Ph.D.)

Citation: Arshad, S., Nematollahi, S., Rouhrazi, K. & Kezrinejhad, N. (2022). Identifying and studying the genetic diversity of pathogenic *Pseudomonas* strains isolated from pepper, onion, and potato in east and west Azerbaijan provinces. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2), 63-83. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17435>.