

شناسایی عوامل باکتریایی دخیل در ایجاد گال روی درختان آلو، گیلاس و سیب

کیوان فرّی^۱، مریم خضری^{۲*}، مسعود ابرین‌بنا^۱ و مینا راستگو^۱

^۱ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

ma_khezri@yahoo.com

چکیده

در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷، با هدف ردیابی بیماری باکتریایی گال طوقه در استان آذربایجان غربی، از باغات آلو، گیلاس و سیب در شهرستان‌های ارومیه، خوی، سلماس و نقده بازدید به‌عمل آمد. در مجموع ۳۲ جدایه ایجادکننده گال روی طوقه گیاه گوجه‌فرنگی، جهت بررسی سایر ویژگی‌ها انتخاب شدند. سویه‌های بیماری‌زا گرم منفی، متحرک و هوازی بودند. برخی از ویژگی‌های فنوتیپی با سویه‌های مولد گال گزارش شده از ایران در مطالعات قبلی تفاوت داشت که بیانگر ناهمگن بودن این سویه‌ها در ایران است. شناسایی مولکولی سویه‌ها بر اساس ژن‌های *virD2*، *ipt* و *virC* و با استفاده از چهار جفت آغازگر اختصاصی انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار مورد بررسی، توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* آلوده شده‌اند. هیچ‌گونه تداخلی در عملکرد آغازگرهای ذکر شده در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه مشاهده نشد، بنابراین این روش شناسایی دقیق به جهت صرفه‌جویی در زمان و مصرف مواد مولکولی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گال طوقه، *Agrobacterium tumefaciens*، *ipt*، *virD2* آذربایجان غربی.

Identification of bacterial agents involved in tumor formation on plum, sweet cherry and apple trees

Kayvan Farri¹, Maryam Khezri^{2*}, Masoud Abrinbana¹ and Mina Rastgou¹

¹ Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

² Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. ma_khezri@yahoo.com

Abstract

During 2018 and 2019, a survey was carried out on detection of bacterial crown gall disease on plum, sweet cherry and apple trees in Urmia, Khoy, Salmas and Naghadeh in West Azarbaijan province. In total, 32 isolates causing gall on the crown of tomato seedlings were selected to identify further characteristics. Pathogenic strains were gram-negative, motile, and aerobic. In some of the phenotypic characteristics, differences were observed compared to the previous reports. These results indicate the existence of heterogeneity among Iranian strains. Molecular identification of strains was based on *virD2*, *ipt*, and *virC* genes using four specific primer pairs. The results of this research showed that the tested stone and pome fruit trees were infected with *Agrobacterium tumefaciens*. No interference was observed in the function of the mentioned primers in the multiplex polymerase chain reaction. Thus, this accurate identification method is recommended by saving time and consumption of molecular materials.

Keywords: Crown gall, *Agrobacterium tumefaciens*, *virD2*, *ipt*, West Azerbaijan.

مقدمه

بیماری گال طوقه از بیماری‌های مهم گیاهان است که گسترش جهانی داشته و اثرات اقتصادی قابل‌توجهی روی عملکرد محصولات مختلف کشاورزی دارد. این بیماری تاکنون از بسیاری از گیاهان دولبه، تعدادی از گیاهان تک‌لیه و بازدانگان گزارش شده است و موجب خسارت‌های کمی و کیفی در نهالستان‌ها، باغ‌ها و مزارع می‌شود. آلودگی به این بیماری موجب کاهش طول عمر درختان و افت شدید تولید محصول می‌گردد (Ferdous *et al.*, 2021). در سال ۲۰۱۶، تقریباً نیمی از نهالستان‌های درختان میوه هسته‌دار در کشور لهستان به بیماری گال طوقه آلوده بوده‌اند که میزان آلودگی در برخی از این نهالستان‌ها، بیش از ۸۰٪ گزارش شده است و این نهال‌ها به دلیل داشتن گال روی ریشه اصلی و طوقه قابل استفاده و فروش نبوده‌اند (Pulawska *et al.*, 2016).

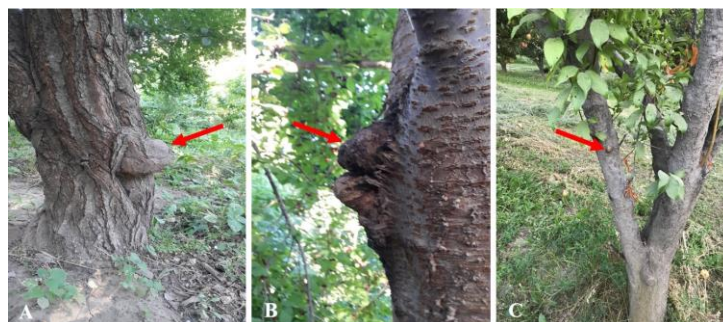
عامل بیماری گال طوقه، باکتری گرم منفی و خاک‌بردار *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Conn 1942 Townsend) از تیره رایزوبیاسه و زیرشاخه آلفا پروتوباکتیریا است که به دلیل زیست‌شناسی قابل توجه آن، مورد مطالعه محققان مختلف به‌ویژه مهندسان ژنتیک گیاهی قرار دارد. راه‌کار این باکتری در کلنیزه کردن بافت میزبان به صورت انتقال بخش T-DNA از پلاسمید Ti به داخل سلول و الحاق آن به ژنوم گیاه است. پلاسمید Ti علاوه بر T-DNA حامل تعدادی ژن بیماری‌زایی (*vir*) است که در انتقال T-DNA به میزبان و ایجاد بیماری نقش دارند. بیان ژن‌های T-DNA باعث تولید بیش از حد هورمون‌های رشدی گیاه که به دنبال آن گال ایجاد می‌شود. هنگامی - که تبدیل سلول‌های عادی به سلول‌های توموری کامل شد، این سلول‌ها بدون حضور باکتری به رشد و تقسیم خود ادامه می‌دهند. دامنه میزبانی *A. tumefaciens* محدود به گیاه نبوده و این باکتری قادر به انتقال DNA خود به سلول‌های پستانداران، مخمرها و قارچ‌ها نیز می‌باشد (Kwon, 2016). در سال‌های گذشته، مطالعاتی در زمینه ردیابی و بررسی ویژگی‌های مختلف باکتری‌های مولد گال روی برخی از گیاهان زینتی، زراعی و درختان میوه در استان‌های شمالی، آذربایجان شرقی، فارس و کهگیلویه و بویراحمد انجام شده است (Shahabi Mohammad Abadi *et al.*, 2012; Rouhrazi and Rahimian, 2013, 2014; Mafakheri *et al.*, 2019; Ganjeh *et al.*, 2020). با توجه به سابقه کشت و افزایش سطح زیرکشت درختان میوه‌های هسته‌دار و دانه‌دار در استان آذربایجان غربی و خسارت ناشی از باکتری عامل بیماری گال طوقه در باغات مناطق مختلف استان و اینکه مطالعه جامعی روی پایش و تشخیص صحیح عوامل مولد گال روی درختان میوه این استان انجام نشده است، این

مطالعه با هدف ردیابی بیماری و شناسایی باکتری‌های عامل بیماری در باغات درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار استان آذربایجان غربی انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری

در طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸، از باغات درختان میوه هسته‌دار (آلو و گیلاس) و دانه‌دار (سیب) در استان آذربایجان غربی بازدید به عمل آمد و به صورت تصادفی از درختان دارای نشانه‌های گال روی تنه و شاخه‌ها نمونه‌برداری شد (شکل ۱). تعداد ۲۰۸ نمونه گال نرم و به رنگ کرم روشن از ۲۶ باغ در اطراف شهرستان‌های ارومیه، خوی، سلماس و نقده جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها درون پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند، و در دمای پایین به آزمایشگاه منتقل شدند.



شکل ۱- نشانه‌های گال ناشی از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* روی درختان سیب (A)، گیلاس (B) و آلو (C).

Fig 1. Gall symptom caused by *Agrobacterium tumefaciens* on apple (A), sweet cherry (B) and plum (C) trees.

جداسازی و نگه‌داری جدایه‌ها

پس از شستشوی گال‌ها، ضدعفونی سطحی آن‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. گال‌های با بافت خشبی و قدیمی‌تر، علاوه بر هیپوکلریت سدیم، با پنبه آغشته به اتانول ۷۰٪ نیز ضدعفونی شدند. گال‌ها در آب مقطر سترون خرد شده و پس از ۳۰ دقیقه، یک لوپ از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار دارای کربنات کلسیم ۵٪ (5% PDA+CaCO₃) کشت شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از

حداقل ۴۸ ساعت و ظهور پرگنه‌های باکتریایی، پرگنه‌های سفید تا کرم رنگ، محدب و گرد با حاشیه صاف انتخاب و روی محیط کشت آگار غذایی (NA) سه بار خالص‌سازی شدند. جهت نگهداری جدایه‌ها، محلول سترون گلیسرول ۲۵٪ به پرگنه‌های کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Schaad *et al.*, 2001).

آزمون اثبات بیماری‌زایی

از گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) رقم سوپر استون در مرحله سه تا چهار برگی برای انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی استفاده شد. از بین جدایه‌های باکتری، ۶۰ جدایه که بیشترین شباهت ریخت‌شناسی به پرگنه‌های *Agrobacterium* داشتند، انتخاب شدند. مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی به روش چندراسکاران و همکاران (Chandrasekaran *et al.*, 2019) انجام شد. گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. جهت اثبات اصول کخ، عمل جداسازی و کشت مجدد باکتری‌ها روی محیط NA از گال‌های ایجاد شده، به روش توضیح داده شده در بخش جداسازی، انجام گرفت و باکتری‌های جداسازی شده از نظر خصوصیات بیوشیمیایی و فنوتیپی با باکتری‌های مایه‌زنی شده مقایسه شدند. آزمون بیماری‌زایی، جهت بررسی ایجاد کالوس روی دیسک‌های هویج و شلغم نیز به روش آيسان و همکاران (Aysan *et al.*, 2003) انجام شد.

بررسی خصوصیات فنوتیپی سویه‌های باکتری بیماری‌زا

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویه‌های باکتری با استفاده از آزمون‌های مندرج در منابع معتبر باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (Klement *et al.*, 1990; Schaad *et al.*, 2001).

شناسایی مولکولی سویه‌های بیماری‌زا

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی باکتری با استفاده از روش لی و دبور (Li and de Boer, 1995) انجام شد. جهت استخراج DNA، از کشت ۴۸ ساعت باکتری روی محیط NA استفاده گردید.

شناسایی مولکولی باکتری‌های بیماری‌زا با آغازگرهای اختصاصی

جهت شناسایی مولکولی سویه‌های بیماری‌زای آگروباکتریوم از آغازگرهای اختصاصی VirD2A/VirD2C'، VirD2A/VirD2E' و CYT/CYT' (Haas *et al.*, 1995) و VCF/VCR (Sawada *et al.*, 1995) (جدول ۱) استفاده شد. در مطالعات پیشین، این آغازگرها بر اساس توالی ژن‌های دخیل

در بیماری‌زایی آگروباکتریوم طراحی و استفاده شده‌اند. طراحی دو جفت آغازگر VirD2A/VirD2C' و VirD2A/VirD2E' بر اساس توالی ژن *virD2* جفت آغازگر CYT/ CYT' بر اساس توالی ژن *ipt* و جفت آغازگر VCF/VCR بر اساس توالی ژن *virC* بوده است.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه.

Table 1. Specific primers used in this study.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference
VirD2A	ATGCCCGATCGAGCTCAAGT	Haas <i>et al.</i> , 1995
VirD2E	CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA	Haas <i>et al.</i> , 1995
VirD2C	TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA	Haas <i>et al.</i> , 1995
CYT	GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT	Haas <i>et al.</i> , 1995
CYT'	GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT	Haas <i>et al.</i> , 1995
VCF	ATCATTGTAGCGACT	Sawada <i>et al.</i> , 1995
VCR	AGCTCAAACCTGCTTC	Sawada <i>et al.</i> , 1995

مخلوط PCR در ۲۵ میکرولیتر، با ترکیب ۱۲ میکرولیتر مخلوط آماده واکنش (PCR Master (Mix Red-Mgcl₂ 180301-50 (Ampliqon)، ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو تهیه شد. برنامه حرارتی واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه رشته DNA (دمای °C ۹۴، سه دقیقه)، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی رشته DNA (دمای °C ۹۴، یک دقیقه)، مرحله اتصال آغازگرها به رشته DNA با دماهای °C ۶۰ (VirD2A/VirD2E')، °C ۶۲ (VirD2A/VirD2C')، °C ۵۵ (CYT/CYT') و °C ۵۷ (VCF/VCR) به مدت یک دقیقه و مرحله بسط رشته DNA (دمای °C ۷۲، یک دقیقه) و در نهایت یک چرخه بسط نهایی (دمای °C ۷۲، ۱۰ دقیقه) بود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه

این آزمون به صورت استفاده توام دو جفت از آغازگرهای ذکر شده در یک مخلوط واکنش انجام شد. به این صورت که یکی از آغازگرهای VirD2A/VirD2C' یا VirD2A/VirD2E' با یکی از آغازگرهای CYT/CYT' یا VCF/VCR در یک مخلوط واکنش استفاده شد. دمای اتصال آغازگرها به رشته DNA نیز، دمای مربوط به آغازگرهای CYT/CYT' یا VCF/VCR، به دلیل کمتر بودن دمای اتصال، در نظر گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر (مدل Gradient Palm TMcycler، ساخت شرکت Corbett Life Science، کشور استرالیا) انجام شد. قطعات ژنومی تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مشاهده و تایید شدند.

نتایج

در این مطالعه، از ۲۰۸ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی با نشانه‌های گال، تعداد ۱۶۸ جدایه باکتری با پرگنه‌های شیری تا کرم رنگ، روی محیط کشت PDA+CaCO₃ 0.5% جداسازی شد (جدول ۲).

جدول ۲- میزبان، محل و زمان نمونه‌برداری باکتری‌های جدا شده از درختان میوه هسته‌دار و سیب دارای نشانه گال.

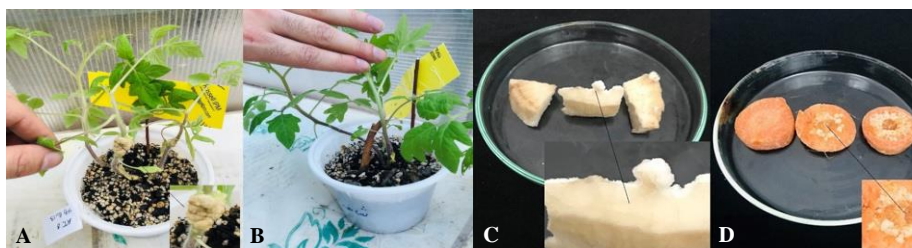
Table 2. Host, location and time of sampling of bacteria isolated from stone fruit and apple trees with the symptom of tumor.

Location of sampling	Host	No. of plant samples	No. of isolated bacteria	Isolate code	No. of pathogenic bacteria	Year of sampling
Urmia	Apple	20	13	U1-U13	4	2018
Urmia	Sweet cherry	27	22	U14-U35	5	2018
Urmia	Plum	16	13	U36-U48	4	2019
Naghadeh	Apple	28	23	N1-N23	5	2018
Naghadeh	Plum	9	7	N24-N30	2	2018
Naghadeh	Sweet cherry	24	21	N31-N51	3	2018
Sardasht	Apple	10	10	S1-S10	2	2019
Sardasht	Plum	33	26	S11-S35	1	2019
Khoy	Sweet cherry	17	13	K1-K13	3	2018
Khoy	Apple	10	8	K14-K21	0	2018
Khoy	Plum	14	11	K22-K32	3	2018
Total		208	167		32	

آزمون اثبات بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی روی ۶۰ جدایه باکتری که بیشترین شباهت ظاهری را به پرگنه باکتری-های جنس *Agrobacterium* داشتند، انجام شد. تعداد ۳۲ جدایه بیماری‌زا بودند (جدول ۲) و روی طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی گال ایجاد نمودند. در بین سویه‌های گال‌زا، زمان ظهور گال بین سه تا پنج هفته متغیر بود. سویه‌های AT-N21 و AT-K2، ۲۲ روز پس از مایه‌زنی و زودتر از سایر سویه‌ها، گال ایجاد نمودند و در نهایت اندازه گال‌ها نیز بزرگ‌تر از سایر سویه‌ها بود. در تیمار شاهد گال تشکیل نشد (شکل ۲A و ۲B).

باکتری‌های جداسازی شده از گال‌های تشکیل شده روی طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، از نظر شکل و رنگ پرگنه و برخی ویژگی‌های فنوتیپی مانند رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و رشد هوازی مشابه جدایه‌های باکتری اولیه بودند و اصول کخ در مورد این سویه‌ها اثبات شد.



شکل ۲- آزمون اثبات بیماری‌زایی سویه *Agrobacterium tumefaciens* AT-N21 تشکیل گال روی طوقه گیاهچه گوجه‌فرنگی (A)، عدم تشکیل گال روی تیمار شاهد (B)، تشکیل کالوس روی قطعات شلغم (C) و هویج (D)، در هر تشتک پتری، قطعه سمت چپ شاهد می‌باشد.

Fig 2. Pathogenicity test of *Agrobacterium tumefaciens* AT-N21. Gall formation on crown of tomato seedling (A), no gall on negative control (B), callus formation on slices of turnip (C) and carrot (D), in each Petri dish, the left slice is negative control.

بر اساس نتایج این تحقیق، از ۳۲ سویه گال‌زا روی طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، تعداد ۳۰ سویه قادر به تولید کالوس با اندازه‌های متفاوت روی قطعات هویج و شلغم بودند (شکل ۲C و ۲D). سویه AT-U7 علی‌رغم توانایی ایجاد گال روی طوقه گیاهچه گوجه‌فرنگی، قابلیت ایجاد کالوس روی قطعات هویج و شلغم را نداشت، همچنین سویه AT-K28 پس از دو بار آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه گوجه‌فرنگی، گال ایجاد نمود ولی روی قطعات هویج و شلغم بافت کالوس تشکیل داد. دو سویه AT-N50 و AT-U10 روی هویج کالوس ایجاد کردند اما روی شلغم کالوسی ایجاد نشد. در این آزمون، سویه AT-K2 و پس از آن سویه‌های AT-N21 و AT-N27 بافت کالوس بزرگتری نسبت به سایر سویه‌ها، روی قطعات هویج و شلغم تشکیل دادند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده کلیه سویه‌ها گرم منفی، متحرک و هوازی اجباری بودند روی محیط‌های کشت NA و 0.5% PDA+CaCO₃، پرگنه‌های سفید تا شیری رنگ، گرد و محدب تشکیل دادند. باکتری‌ها روی محیط کشت 1A پرگنه‌هایی با مرکز قهوه‌ای و حاشیه سفید و روی محیط کشت اختصاصی DIM پرگنه‌هایی گرد، محدب و به رنگ آبی تولید کردند. نتایج آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز توپین ۸۰، لوان، اوره‌آز، احیاء نیترات، تولید ۳-کتولاکتوز مثبت اما نتایج آزمون‌های واکنش فوق‌حساسیت روی توتون، پکتیناز، آرژنین دهیدرولاز، تولید اندول، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ بی منفی بود. واکنش سویه-

های مختلف در آزمون‌های هیدرولیز کازئین، فسفاتاز و متیل رد متغیر بود. کلیه سویه‌ها قادر به مصرف قندهای رافینوز، مالتوز، سلوبیوز، فروکتوز، آدونیتول، مانیتول، رامنوز، گالاکتوز، آرابینوز، سوکروز، زایلوز، دکستروز، ترهالوز، فنیل آلانین و سترات بودند اما در مصرف دولسیتول، لاکتوز و سوربیتول متغیر بودند. نتایج سایر آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌های بیماری‌زا در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های بیماری‌زای *Agrobacterium tumefaciens* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار و سیب در استان آذربایجان غربی.

Table 3. Phenotypic Characteristic of pathogenic strains of *Agrobacterium tumefaciens*, isolated from stone fruit and apple trees in West Azarbaijan province.

Characteristic	Reaction	Characteristic	Reaction
Gram staining	-	Growth on 1A and DIM	+
Anaerobic growth	-	Tween 80 hydrolysis	+
Oxidase	+	Colony color on NA	C
Motility	+	Colony color on YDC	Y
Catalase	+	Fluorescent pigment production	-
Arginine dihydrolase	-	3- Keto lactose formation	+
HR reaction	-	Use of:	
Levan formation	+	L-Phenylalanine	+
Gelatin hydrolysis	-	D-Galactose	+
Aesculin hydrolysis	+	L-Arabinose	+
Starch hydrolysis	-	D-Arabinose	+
Casein hydrolysis	V	Maltose	+
Urease	+	Lactose	V
Tyrosinase activity	-	Adonitol	+
Growth at 4 °C	-	D-Sorbitol	V
Growth at 40 °C	-	D-Xylose	+
NaCl 4% tolerance	+	L-Xylose	+
NaCl 5% tolerance	+	Dulcitol	V
NaCl 7% tolerance	-	L-Rhamnose	+
Indole formation	-	Citrate	+
H ₂ S from cysteine	-	Raffinose	+
NO ₃ reduction	+	D-Mannitol	+
Methyl red	V	Dextrose	+
Potato soft rot	-	Fructose	+
Litmus milk	V	Trehalose	+
Phosphatase	V	Cellobiose	+
Lecithinase	-	Sucrose	+

+ : واکنش مثبت، - : واکنش منفی، V : واکنش متغیر، C : رنگ پرگنه کرم، Y : رنگ پرگنه زرد.

+ : Positive reaction, - : Negative reaction, V : Variable reaction, C : Color of colony is cream, Y : Color of colony is yellow.

شناسایی مولکولی سویه‌های باکتری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

بر اساس نتایج PCR با استفاده از جفت آغازگر VirD2A/VirD2C'، ۸۷٪ از سویه‌های باکتری قادر به تکثیر قطعه ۲۲۴ جفت‌بازی بودند، همچنین ۸۰٪ از سویه‌های باکتری توانستند قطعه ۳۳۸ جفت‌بازی را به واسطه جفت آغازگر VirD2A/VirD2E' تکثیر کنند. دو سویه AT-K9 و AT-K28 قادر به تکثیر قطعه ۲۲۴ جفت‌بازی نبودند، همچنین سویه‌های AT-U6، AT-U9 و AT-N27 هم نتوانستند قطعه ۳۳۸ جفت‌بازی را تکثیر نمایند. در PCR با استفاده از جفت آغازگر CYT/CYT' ۷۴٪ از سویه‌های بیماری‌زا قادر به تکثیر قطعه ۴۲۷ جفت‌بازی بودند، اما این قطعه در سویه‌های AT-N2، AT-U22، AT-N19 و AT-K30 تکثیر نشد. قطعه ۷۳۰ جفت‌بازی در اکثر سویه‌های باکتری مورد مطالعه با استفاده از جفت آغازگر VCF/VCR تکثیر شد اما سویه‌های AT-U20، AT-U43، AT-NI و AT-K17 با این جفت آغازگر بانندی تشکیل ندادند (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج PCR جدایه‌های منتخب بیماری‌زای *Agrobacterium tumefaciens* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی.

Table 4. Results of PCR of selected pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* strains using specific primers.

Strain	VirD2A/C	VirD2A/E	CYT/CYT'	VCF/VCR
<i>A. tumefaciens</i> AT-U2	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U6	+	-	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U9	+	-	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U18	+	-	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U22	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U31	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U37	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-U46	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N3	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N15	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N21	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N25	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N27	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-N50	+	-	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-S5	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-K2	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-K9	+	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-K23	-	+	+	+
<i>A. tumefaciens</i> AT-K28	-	+	+	+

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس چندگانه

در استفاده همزمان دو جفت آغازگر 'VirD2A/VirD2C' یا 'VirD2A/VirD2E' با یکی از آغازگرهای 'CYT/CYT' یا 'VCF/VCR'، قطعات DNA مربوط به هر آغازگر تکثیر و باندهای مربوطه روی ژل آگارز مشاهده شد. هیچ‌گونه تداخلی در عملکرد آغازگرها با هم دیده نشد.

بحث

در این مطالعه، درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار دارای نشانه گال روی شاخه‌ها و تنه، در باغ-های اطراف ارومیه، خوی، نقده و سردشت، واقع در استان آذربایجان غربی، مورد بررسی قرار گرفتند و در مجموع تعداد ۳۲ جدایه باکتری عامل بیماری، از نمونه‌های گال درختان سیب، آلو و گیلاس جداسازی شد.

از تعداد زیادی از گال‌های جمع‌آوری شده، به‌ویژه گال‌های دارای بافت سخت، چوبی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، هیچ باکتری بیماری‌زایی جداسازی نشد. این موضوع به روند توسعه بیماری در گیاه بدون حضور باکتری برمی‌گردد. به عبارتی پس از ورود باکتری به گیاه میزبان، T-DNA به درون سلول‌های گیاهی انتقال یافته و پس از ادغام T-DNA با ژنوم گیاه و بیان ژن‌های تولیدکننده هورمون‌های رشدی گیاه، میزان اکسین و سیتوکینین در سلول‌ها به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد که سبب افزایش حجم سلول‌ها (هایپرتروفی) و افزایش سرعت تکثیر (هایپرپلازی) آن‌ها در محل نفوذ باکتری و در ادامه تشکیل گال می‌شود. تحقیقات نشان داده است که پس از ایجاد عفونت در گیاه و الحاق T-DNA به ژنوم گیاه، حضور باکتری برای توسعه بیماری مورد نیاز نبوده و به همین دلیل باکتری در بیشتر گال‌های قدیمی جداسازی نمی‌شود (Ferdous *et al.* 2021; Singh *et al.*, 2021).

در این تحقیق، از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف که به طور معمول برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌های گال‌زا به کار گرفته می‌شود، استفاده شد. از جمله آزمون‌های تشخیصی، تولید ۳-کتولاکتوز از α -لاکتوز است (Schaad *et al.*, 2001; Pulawska *et al.*, 2016). در این تحقیق، تمام سویه‌های گال‌زا، توانایی تولید ۳-کتولاکتوز را داشتند. مشابه همین نتایج در مطالعه پولاسکا و همکاران (Pulawska *et al.*, 2016) گزارش شده است، به‌طوری‌که سویه‌های کمپلکس *A. tumefaciens*، قادر به تولید ۳-کتولاکتوز از α -لاکتوز بودند. در بررسی‌های دیگر، ۱۵ سویه جدا شده از شمشاد طلایی (*Euonymus japonicus*) در گلخانه‌های مازندران (Ganjeh *et al.*,

(2020) و سویه‌های *A. tumefaciens* جداسازی شده از میزبان‌های گل رز، مو و چغندر قند در استان- های فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Shahabi Mohammad Abadi et al., 2012) قادر به تولید ۳- کتولاکتوز بودند. سویه‌های جدا شده از گال در این مطالعه گرم منفی و متحرک بودند و نتایج آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تحمل نمک چهار و پنج درصد، لوان، هیدرولیز توپین ۸۰، رشد هوازی اجباری، هیدرولیز اسکولین، آرژنین دهیدرولیز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، تولید اندول، تولید رنگدانه‌های فلورسنت روی محیط کینگ بی، لسیتیناز، تولید گاز سولفید هیدروژن از سیستئین، واکنش فوق‌حساسیت، فعالیت تیروزیناز، رشد در دماهای چهار و ۴۰ درجه سلسیوس، تحمل نمک هفت درصد، لهانیدن سیب‌زمینی با منابع معتبر باکتری‌شناسی (Klement et al., 1990; Rouhrazi and Rahimian, 2001) و مطالعات سایر محققین (Klement et al., 1990; Schaad et al., 2001) هم‌خوانی داشت. واکنش اوره‌آز در تمامی سویه- های این مطالعه مثبت بود که این نتیجه در مطالعات گنجه و همکاران (Ganjeh et al., 2020) نیز گزارش شده است، در حالی که سویه‌های *A. tumefaciens* مورد مطالعه شهابی و همکاران (Shahabi Mohammad Abadi et al., 2012) واکنش اوره‌آز متغیر داشتند. نتیجه آزمون احیاء نیترات سویه‌های این مطالعه مثبت بود، اما این قابلیت مغایر نتایج گزارش شده از سویه‌های *A. tumefaciens* در مطالعات برخی محققین (Ganjeh et al., 2020) می‌باشد.

نتایج آزمون‌های فنوتیپی سویه‌های مختلف متعلق به یک گونه باکتریایی ممکن است متفاوت باشد، به عنوان مثال، سه سویه AT-U22، AT-S5 و AT-N27 که در آزمون شیر لیتاموس به ترتیب واکنش رسوب، اسیدی و قلیایی از خود نشان دادند، بر اساس آزمون‌های مولکولی، همگی متعلق به گونه *A. tumefaciens* بودند. در آزمون شیر لیتاموس، سویه‌های گال‌زای *A. tumefaciens* جداسازی شده از گردو و مو (Rouhrazi and Rahimian, 2013, 2014) و ۲۳ سویه *A. tumefaciens* جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار (Pulawska et al., 2016) واکنش قلیایی نشان داده بودند، در حالی که در این مطالعه، ۷۰٪ سویه‌ها واکنش قلیایی، ۵٪ واکنش اسیدی و ۲۵٪ رسوب تشکیل دادند. نتایج آزمون‌های متیل رد، فسفاتاز و کازئین نیز در میان سویه‌ها متغیر بود، به طوری که ۱۰٪ از سویه‌ها در هیدرولیز کازئین، ۳۰٪ در آزمون متیل رد و ۶۵٪ در آزمون فسفاتاز واکنش مثبت نشان دادند. بر اساس نتایج این تحقیق، قند لاکتوز توسط ۹۵٪ سویه‌ها مصرف شد اما فقط ۲۰٪ سویه‌ها قادر به مصرف قند سوربیتول و ۶۰٪ قادر به مصرف قند دولسیتول بودند. نتیجه مصرف رافینوز و

سیترات به عنوان منبع کربن در سویه‌های مورد مطالعه کازمانوویک و همکاران (Kuzmanovic *et al.*, 2018) متغیر بود در حالی که همه سویه‌های این مطالعه قادر به مصرف این منابع کربنی بودند. سایر قندها و فنیل‌آلنین توسط سویه‌های این مطالعه مصرف شدند که مشابه منابع معتبر باکتری-شناسی (Klement *et al.*, 1990; Schaad *et al.*, 2001) است. به طور کلی، نتایج متفاوت آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی *A. tumefaciens* بیانگر ناهمگن بودن سویه‌های یک گونه بوده و می‌تواند از عوامل مختلفی از جمله سازگاری سویه‌ها با مواد مترشحه از ریشه‌های میزبان ناشی شده باشد (Vladimirov *et al.*, 2015).

شناسایی مولکولی سویه‌ها با استفاده از چهار جفت آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز انجام شد. دو جفت آغازگر VirD2A/VirD2C' و VirD2A/VirD2E'، جهت تفکیک سویه‌های بیماری‌زا از سویه‌های غیربیماری‌زا آگروباکتریوم استفاده شدند. به منظور تفکیک باکتری‌های *A. tumefaciens* و *Allorhizobium vitis* (با دامنه میزبانی بالا) از باکتری‌های *Agrobacterium rhizogenes* و *Al. vitis* (با دامنه میزبانی پایین) از جفت آغازگر CYT/CYT' و جهت تفکیک باکتری *A. tumefaciens* از باکتری *Al. vitis* از جفت آغازگر VCF/VCR استفاده شد. از بافت یک گال ممکن است گونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا *Agrobacterium* که ویژگی‌های فنوتیپی مختلفی داشته و به گروه‌های تبارشناسی مختلف تعلق دارند، جداسازی شوند. این موضوع ارزیابی اینکه کدام باکتری یا باکتری‌ها، در ایجاد گال مشارکت داشته‌اند را دشوار می‌نماید. بنابراین برای پی بردن به تنوع پلاسمیدهایی که به طور مشترک در بروز گال طوقه گیاهان نقش داشته‌اند، لازم است تحقیقاتی در سطح جمعیت باکتری‌ها و Ti-plasmid آن‌ها انجام شود (Faist *et al.*, 2016).

نتایج استفاده از آغازگرهای اختصاصی در شناسایی مولکولی سویه‌های باکتری نشان داد، جفت آغازگر VirD2A/VirD2C' قادر به شناسایی ۸۷٪ سویه‌های بیماری‌زای این مطالعه بود و جفت آغازگر VirD2A/VirD2E' توانست ۸۰٪ این سویه‌ها را شناسایی کند. بنابراین جفت آغازگر VirD2A/VirD2C' دارای دامنه شناسایی بیش‌تری می‌باشد. نتایج مطالعات قبلی نیز نشان داده است که استفاده از جفت آغازگر VirD2A/VirD2C' به تنهایی برای ردیابی سویه‌های بیماری‌زا کافی نیست که با نتایج این مطالعه همسو می‌باشد (Bini *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای در ایران نیز، جفت آغازگر VirD2A/VirD2C'، تعداد ۹۲ سویه بیماری‌زا را از بین ۱۰۵ سویه باکتری جنس

Agrobacterium شناسایی کرد (Rouhrazi and Rahimian, 2013)، همچنین در مطالعه‌ای دیگر، بیماری‌زایی سویه‌های *Agrobacterium* با تکثیر قطعه ۲۲۴ جفت بازی با استفاده از این جفت آغازگر تایید شد (Ganjeh et al., 2020). یافته‌های این مطالعه، استفاده توأم این دو جفت آغازگر را جهت ردیابی سویه‌های بیماری‌زای *A. tumefaciens* تایید می‌نماید. همانطور که در تحقیقات پیش از این نیز هاس و همکاران (Haas et al., 1995) جهت ردیابی سویه‌های بیماری‌زای *A. tumefaciens* از این دو جفت آغازگر استفاده کرده‌اند. در مطالعه حاضر، نتایج مثبت تکثیر ژن *virD2*، نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های اثبات بیماری‌زایی با ایجاد گال روی طوقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و ایجاد کالوس روی قطعات هویج و شلغم را تایید کرد. سویه AT-K28 روی طوقه گیاهچه گوجه‌فرنگی گال ایجاد نکرد ولی روی قطعات شلغم و هویج بافت کالوس تشکیل داد، از طرفی سویه AT-U7 قابلیت بیماری‌زایی روی گیاه گوجه‌فرنگی را داشت اما روی قطعات هویج و شلغم بافت کالوس تشکیل نداد. دو سویه AT-U10 و AT-N50 نیز روی شلغم کالوس تولید نکردند در حالی که روی طوقه گوجه‌فرنگی گال و روی قطعات هویج کالوس تولید کردند و بیماری‌زا بودن همه این سویه-ها با تکثیر ژن *virD2* با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی تایید شد. این تنوع در بیماری‌زایی در گیاهان محک، در سویه‌های ایرانی جدا شده از درختان هلو، سیب و گل سرخ نیز مشاهده شده است که می‌توان آن را به تنوع در دامنه میزبانی سویه‌های بیماری‌زا نسبت داد (Mafakheri et al., 2019). پیشتر نیز از دست دادن خودبه‌خودی توانایی بیماری‌زایی سویه‌های *Agrobacterium* روی برخی از میزبان‌هایش مشاهده و گزارش شده است (Pulawska et al., 2016).

گزارش‌های محققان نشان می‌دهد که گاهی اوقات در درون یک گال، مجموعه‌ای از گونه-های مختلف اگروباکتریوم گال‌زا، از قبیل *Al. vitis* و *A. tumefaciens*، و یا باکتری عامل پررشدی ریشه (*A. rhizogenes*) توأم حضور دارند (Pulawska et al., 2016). در این مطالعه، جهت تفکیک سویه‌های *A. tumefaciens* از سایر گونه‌های *Agrobacterium* از جفت آغازگرهای CYT/CYT' (Haas et al., 1995) استفاده شد. این جفت آغازگر که بر اساس توالی ژن *ipt* طراحی شده است، قادر به تفکیک گونه‌های *A. tumefaciens* و *Al. vitis* با دامنه میزبانی بالا، از گونه‌های *A. rhizogenes* و *Al. vitis* با دامنه میزبانی پایین است. در این مطالعه، همچنین از جفت آغازگر VCF/VCR (Sawada et al., 1995) جهت تکثیر ژن *virC*، به منظور تفکیک گونه *A. tumefaciens* از *Al. vitis* بهره برده شد. با توجه به تکثیر ژن‌های *ipt* و *virC* در همه سویه‌های این مطالعه، احتمال وجود گونه‌های *Al. vitis* و

A. rhizogenes در بین سویه‌های مولد گال رد شد که با مطالعات سایر محققان در شناسایی *A. tumefaciens* همخوانی داشت (Sawada et al., 1995; Szegedi and Bottka, 2002). در این مطالعه، جفت آغازگر 'CYT/CYT' یا VCF/VCR و جفت آغازگرهای 'VirD2A/VirD2C' یا 'VirD2A/VirD2E' به صورت توأم در یک مخلوط واکنش استفاده شدند. در این روش، هیچ‌گونه تداخلی در عملکرد آغازگرها با هم مشاهده نشد و باندهای مربوط به هر جفت آغازگر به خوبی تکثیر شدند. با توجه به نتیجه به‌دست آمده، این روش به جهت صرفه‌جویی در زمان و مصرف مواد مولکولی توصیه می‌شود.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های فنوتیپی و فیزیولوژیکی، همچنین تکثیر قطعات DNA مربوط به ژن‌های *virC*، *virD2* و *ipt* در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، عامل مولد گال روی شاخه‌ها و تنه‌های درختان گیلاس، آلو و سیب در استان آذربایجان غربی، باکتری *A. tumefaciens* تشخیص داده شد. با توجه به اینکه شناخت دقیق عامل بیماری‌زا می‌تواند در ارائه راهکارهای مدیریت بیماری موثر باشد، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌هایی روی امکان وجود گونه‌های دیگر *Agrobacterium* مولد گال درختان میوه و تعیین گونه(های) غالب موجود در گال‌ها، همچنین ویژگی‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری‌زایی این عوامل بیمارگر انجام گردد.

منابع

- AYSAN, Y., F. SAHIN, M. MIRIK, M.F. DONMEZ, and H. TEKMAN, 2003. First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *Plant Pathology*, 52: 793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00902.x>.
- BINI, F., K. GEIDER, and C. BAZZI, 2008. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 403-411. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9307-0>.
- CHANDRASEKARAN, M., J.M. LEE, B.M. YE, S.M. JUNG, J. KIM, J.W. KIM, and S.C. CHUN, 2019. Isolation and characterization of avirulent and virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* from rose crown gall in selected regions of South Korea. *Plants (Basel)*, 8(11): 452. <https://doi.org/10.3390/plants8110452>.
- FAIST, H., A. KELLER, U. HENTSCHEL, and R. DEEKEN, 2016. Grapevine (*Vitis vinifera*) crown galls host distinct microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 5542-5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>.
- FERDOUS, M.L., M.N. HOSSAIN, M.O. ALI, M.S. ISLAM, and S. YASMIN, 2021. Morphological, biochemical and molecular identification of the wild strain of *Agrobacterium tumefaciens* from crown gall infected mango tree. *Fundamental and Applied Agriculture*, 6(1): 43-49. <https://doi.org/10.5455/faa.136134>.
- GANJEH, A., H. RAHIMIAN, V. BABAEIZAD, and E. BASAVAND, 2020. Stem and crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* on Golden Euonymus in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 102: 1307. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00593-4>.

- HAAS, J.H., L.W. MOORE, W. REAM, and S. MANULIS, 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2879-2884. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.2879-2884.1995>.
- KLEMENT, Z., K. RUDOLPH, and D.C. SANDS, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary. 568 pp. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620310214>.
- KUZMANOVIC, N., J. PULAWSKA, K. SMALLA, and X. NESME, 2018. *Agrobacterium rosae* sp. nov., isolated from galls on different agricultural crops. *Systematic and Applied Microbiology*, 41: 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.004>.
- KWON, T. 2016. Mitochondrial porin isoform AtVDAC1 regulates the competence of *Arabidopsis thaliana* to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Molecules and Cells*, 39: 705-713. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0159>.
- LI, X. and S.H. DE BOER, 1995. Selection of primers for polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepidonicus*. *Phytopathology*, 85(8): 837-842. <https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:31>.
- MAFAKHERI, H., S.M. TAGHAVI, J. PULAWSKA, P. DE LAJUDIE, F. LASSALLE, and E. OSDAGHI, 2019. Two novel genomospecies in the *Agrobacterium tumefaciens* species complex associated with rose crown gall. *Phytopathology*, 109: 1859-1868. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0178-R>.
- PULAWSKA, J., W. WARABIEDA, and E. ISMAIL, 2016. Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland. *Plant Pathology*, 65: 1034-1043. <https://doi.org/10.1111/ppa.12482>.
- ROUHRAZI, K. and H. RAHIMIAN, 2013. Determination of Rhizobium species and heterogeneity of strains causing grapevine crown gall disease by IS50-PCR. *Agricultural biotechnology Journal*, 5(1): 39-56. (in Persian with English summary). <https://doi.org/10.22103/JAB.2013.1188>.
- ROUHRAZI, K. and H. RAHIMIAN, 2014. Biochemical and genetic characterization of *Agrobacterium tumefaciens* the causal agent of walnut crown gall disease in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47 (20): 2493-2500. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.880575>.
- SAWADA, H., H. LEKI, and I. MATSUDA, 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmid from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 828-831.
- SCHAAD, N.W., J.B. JONES, and W. CHUN, 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed., APS Press, St. Paul, MN, USA. 373 pp. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>.
- SHAHABI MOHAMMAD ABADI, M., S.M. TAGHAVI, and M. DJAVAHERI, 2012. Phenotypic and genotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates from different hosts in Fars and Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(3): 329-341. (in Persian with English summary).
- SINGH, N.K., C. LAVIRE, J. NESME, L. VIAL, X. NESME, C.E. MASON, F. LASSALLE, and K. VENKATESWARAN, 2021. Comparative genomics of novel *Agrobacterium* G3 strains isolated from the international space station and description of *Agrobacterium tomkonis* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 12: 765943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765943>.
- VLADIMIROV, I.A., T.V. MATVEEVA, and L.A. LUTOVA. 2015. Opine Biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics*, 51: 121-129. <http://doi.org/10.1134/S1022795415020167>.