

DOI: <https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13500>

بررسی پتانسیل آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت همراه با درختان میوه دانه‌دار در استان آذربایجان غربی بر علیه *Erwinia amylovora* و ارزیابی تنوع ژنتیکی آنها

حبیب نوجوان چیچکلوی منصور^۱، عباسعلی روانلو^۲، سعید طریقی^۱

^۱بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. ^۲بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. aravanlou@gmail.com

پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۵

بازنگری: ۹۹/۱۱/۱۹

دریافت: ۹۹/۱۱/۱۱

چکیده

در شاخ و برگ‌های درختان میوه دانه‌دار، باکتری‌های اپی‌فیت زیادی وجود دارند که خاصیت آنتاگونیستی آنها علیه عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) اثبات شده است. به منظور شناسایی، بررسی پتانسیل آنتاگونیستی و تنوع ژنتیکی باکتری‌های اپی‌فیت آنتاگونیستی همراه با درختان میوه‌دانه دار در استان آذربایجان غربی، از باغات سیب، گلابی و به در سه نوبت بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۹۳ نمونه‌برداری به عمل آمد. پس از جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت و انجام آزمون آنتاگونیستی، شناسایی جدایه‌ها صورت گرفت. جدایه‌ها در دو گروه باکتری‌های گرم منفی (*Pantoea* و *Pseudomonas fluorescens agglomerans*) و گرم مثبت دسته‌بندی شدند. تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *Pantoea* و *Pseudomonas* از مناطق مختلف با استفاده از روش Rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها با استفاده از برنامه‌ی نرم‌افزاری NTSYS به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده بر اساس نشانگر BOX1 نشان دهنده وجود ۱۰ گروه با حداقل شباهت ۷۵ درصد در میان جدایه‌های *Pseudomonas* و وجود ۹ گروه در میان جدایه‌های *Pantoea* با حداقل شباهت ۷۰ درصد بود. نتایج تنوع ژنتیکی بالایی را در میان سویه‌های آنتاگونیست اپی‌فیت درختان میوه دانه‌دار در استان آذربایجان غربی نشان داد.

کلمات کلیدی: اپی‌فیت، آتشک، دانه‌دار، *Pantoea agglomerans*، *Pseudomonas fluorescens*

Antagonistic potential of epiphytic bacteria associated with pome fruit trees in West Azarbaijan province against *Erwinia amylovora* and evaluation of their genetic diversity

Habib Nojavan Chichaklou Mansour¹, Abbasali Ravanlou², Saeed Tarighi¹

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. ²Department of Plant Diseases Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. aravanlou@gmail.com

Received: 30 Jan 2021

Revised: 7 Feb 2021

Accepted: 15 Mar 2021

Abstract

There are many epiphytic bacteria live on surface of pome fruit tree foliage, and have been proven to show antagonistic activity against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. In order to characterize and assess antagonistic potential and genetic diversity of epiphytic bacteria associated with pome fruit trees in orchards of West Azarbaijan province samplings were carried out from foliage of apple, pear, and quince trees during spring, summer and autumn in 2014. Epiphytic bacteria were isolated and their antagonistic potential against *E. amylovora* were evaluated and then bacterial isolates were identified. The isolated bacteria were categorized into three group including *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* and other unknown Gram-positive bacteria. Genetic diversity among the *Pseudomonas* and *Pantoea* isolates were studied using Rep-PCR technique. Resulted data were analyzed in NTSYSpc v2.02e software and compared using UPGMA and Jaccard similarity coefficient methods. Also, the analyses of the BoxA1R primer's band patterns separated ten groups with at least 75% similarity among the pseudomonad isolates. Similarly, nine groups with 70% similarity within the *Pantoea* isolates were discovered. These results showed a high genetic diversity among the epiphytic strains of *Pseudomonas* and *Pantoea* in west Azarbaijan pome fruit orchards.

Keywords: Epiphyte, Fire blight, Pome fruit, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*

How to cite:

Nojavan Chichaklou Mansour H, Ravanlou AA, Tarighi S, 2022. Antagonistic potential of epiphytic bacteria associated with pome fruit trees in West Azarbaijan province against *Erwinia amylovora* and evaluation of their genetic diversity *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (1): 109–120.

مقدمه

به کاهش قابل توجه بیماری می‌شود (Johnson et al. 2009). از عوامل دیگر مهار زیستی آتشک می‌توان به باکتری‌های *P. graminis*، *Rahnella aquatilis* (یک انتروباکتر گرم منفی)، جدایه‌های مختلف *Bacillus subtilis* (گرم مثبت)، و جنس‌های مختلف *Streptomyces*، *Arthrobacter*، *Pseudomonas*، *Xanthomonas plantarum* جمع‌آوری شده از میکروفلور گیاهان میزبان رزاسه اشاره کرد، که اثرات آنتاگونیستی روی *E. amylovora* دارند. با دو باکتری اپی‌فیت تازه ردیابی شده روی درختان میوه دانه‌دار *E. amylovora* و *E. billingiae* Geider et al. (2015) به ترتیب در آفریقای جنوبی و استرالیا (van der Zwet et al. 2011) (Blightban A506) این کاهش یافت (Pusey et al. 2009). نمونه‌های لیوفیلیزه شده *P. fluorescens* A506 امروزه به صورت تجاری برای اسپری روی گل‌ها در اوایل بهار جهت کنترل بیماری در دسترس است (van der Zwet et al. 2011). این آنتاگونیست‌ها همچنین از گل‌های تلقیح شده به گل‌های تلقیح نشده به آسانی حرکت می‌کنند. با توجه به مباحث فوق، هدف از بررسی حاضر شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت آنتاگونیست باکتری عامل آتشک گلابی بر اساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی و همچنین تعیین تنوع ژنوتیپی و گروه‌بندی آنها در چند شهرستان استان آذربایجان غربی می‌باشد.

روش بررسی

نمونه برداری و موقعیت جغرافیایی محل نمونه برداری

به منظور جداسازی و بررسی باکتری‌های اپی‌فیت درختان میوه دانه‌دار و عامل بیماری آتشک درختان گلابی و سیب در بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۹۳ از شاخ و برگ، گل و میوه باغات به، سیب و گلابی موجود در شهرستان‌های مختلف استان آذربایجان غربی از جمله ارومیه، سلماس، مهاباد، نقده، محمدیار، میاندوآب، اشنویه و خوی نمونه‌برداری به‌عمل آمد. نمونه‌ها ابتدا در محل سایه، سبز خشک شدند و سپس در داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه بیماری‌شناسی انتقال یافته و جداسازی انجام گرفت. نمونه‌برداری در چند مرحله به صورت تصادفی انجام شد.

جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت و عامل بیماری آتشک

جداسازی باکتری‌ها به روش (Dias et al. 2015) با اندکی تغییر انجام شد. به‌طوریکه پس از خرد کردن نمونه‌ها با قیچی باغبانی سترون و مخلوط نمودن برگ‌ها، گل‌ها، سرشاخه‌ها با یکدیگر، از مخلوط نمونه‌های به دست آمده به‌صورت تصادفی ۲۰

اندام‌های هوایی گیاه به‌طور معمول توسط تعدادی از باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و تا حدودی جلبک‌ها، آغازیان و نماتدها کلونیزه می‌شوند. روی سطوح برگ، باکتری‌ها و پس از آن مخمرها بیشترین فراوانی را دارند (Manceau et al. 1990; Mina et al. 2020). منطقه اطراف برگ، گل، میوه، شاخه و ساقه که توسط میکروارگانیسم‌ها کلونیزه می‌شوند، فیلوسفر نام دارد و به این موجودات اپی‌فیت گفته می‌شود. فیلوسفر یکی از شایع‌ترین زیستگاه‌های میکروبی روی کره زمین است (Bringel & Couee 2015). این موجودات سلامت گیاه و توسعه بیماری‌های گیاهی را در قالب بیمارگرها، همزیست‌ها و آنتاگونیست‌ها و یا از طریق القای پاسخ‌های دفاعی، تحت تاثیر قرار می‌دهند (Dukare et al. 2018; Carmona-Hernandez et al. 2019; Hakim Rabet & Ketabchi 2021). از مهمترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار که سالانه خسارت زیادی را به این درختان وارد می‌سازد، بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* است. این باکتری بهترین نمونه از باکتری‌های مولد نکروز است که به‌صورت بین سلولی در میزبان خود رشد می‌کند و به سرعت بافت‌های میزبان را در نقاط شروع آلودگی از بین می‌برد (Johnson et al. 2009). بیماری به احتمال زیاد در سال ۱۹۸۹ از شرق ترکیه وارد ایران شده است و تا به حال از بیش از ۴۶ کشور جهان گزارش شده است (van der Zwet et al. 2011). میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت ممکن است تجزیه کننده پکتین، سلولز و پروتئین بوده و دارای فعالیت‌های ضد میکروبی باشند که در برخی موارد برای انسان نیز بیماری‌زا هستند. چنین میکروارگانیسم‌هایی ترکیبات مهم صنعتی نظیر ویتامین‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی و آنزیم‌ها را سنتز می‌کنند (Dias et al. 2015). فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های باکتریایی جدا شده از فیلولپلان روی بیماری‌های گیاهی به خوبی ثبت شده است (Lorenzini & Zapparoli 2020). مزیت اصلی استفاده از عوامل مهار زیستی این است که برای یک بیمارگر اختصاصی هستند و به گونه‌های غیرهدف هیچ ضرری نمی‌رسانند (O' Brien 2017). مثال معروف مهار زیستی در بیماری‌های اندام‌های هوایی، کنترل بیماری باکتریایی آتشک می‌باشد. باکتری‌های متعلق به جنس‌های پانتوا و سودوموناس دو گروه عمده بیوکنترل *E. amylovora* هستند. استقرار قبلی سطوح کلاله گل‌ها با باکتری‌های غیربیماری‌زا و آنتاگونیست مانند سویه A506 و سویه C9-1 به ترتیب *Pseudomonas fluorescens* و *Pantoea agglomerans* تا حد زیادی می‌تواند مانع استقرار بیمارگر آتشک شود که منجر

تا ۳۰ گرم انتخاب شدند. نمونه‌های وزن شده از سه میزبان سیب، به و گلابی به داخل ارلن‌های یک لیتری همراه با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و چند قطره تویین ۲۰ به مدت یک ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. سپس از هر ارلن سری رقت تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱/۱۰^۲ به روش پخش در پتری (Spread plate method) روی محیط کشت King's B و Nutrient agar پخش گردید. جداسازی عامل بیماری نیز از شاخ و برگ‌هایی که علائم سوختگی را نشان می‌دادند، انجام شد. بدین منظور ابتدا برگ‌ها توسط اتانول ۷۸ درصد ضدعفونی سطحی شدند. سپس با استفاده از قیچی سترون به خوبی خرد و له شد و در آب مقطر سترون به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند به طوری که هر ده دقیقه برگ‌ها در داخل آب به آرامی هم زده شدند. سپس با استفاده از لوپ سترون مقداری از سوسپانسیون باکتری در تشتک‌های پتری حاوی محیط NA بصورت زیگزاگی کشت گردیدند. همه‌ی تشتک‌های پتری حاوی باکتری‌های اپی‌فیت و عامل بیماری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به انکوباتور منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت، تشتک‌های پتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

غربال باکتری‌های اپی‌فیت جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی در برابر عامل بیماری آتشک (*E. amylovora*) کشت تازه ۴۸ ساعته از تمامی باکتری‌های اپی‌فیت تهیه شد و خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها به روش Petruta et al. (2008) ارزیابی گردید. پس از تهیه محیط M9 (۶۴ گرم Na_2HPO_4 ، ۱۵ گرم KH_2PO_4 ، ۲/۵ گرم NaCl و ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، سوسپانسیون حاوی باکتری عامل بیماری آتشک با غلظت 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر به محیط M9 اضافه شد، به طوری که کاملاً با آن مخلوط گردید و سپس درون تشتک‌های پتری ریخته شد. با استفاده از شانه مخصوص باکتری‌های اپی‌فیت به محیط تلقیح شد و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، تشتک‌های پتری جهت مشاهده‌ی خاصیت آنتاگونیستی بررسی شده و قطر هاله بازدارندگی از رشد باکتری *E. amylovora* اندازه‌گیری شد (Pusey et al. 2009).

تهدیه اینوکولوم و آزمون اثبات بیماری‌زایی عامل بیماری آتشک

از کشت تازه‌ی باکتری در محیط NA سوسپانسیونی به غلظت 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر سلول باکتری (معادل جذب نوری برابر یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر سترون تهیه و جهت مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت (Pusey et al. 2009). میوه‌های نارس گلابی جهت مایه‌زنی انتخاب و برای مشاهده‌ی نتیجه در شرایط مرطوب به مدت چند روز تا یک هفته نگهداری شدند (Manceau et al. 1990).

آزمون فوق حساسیت

در این آزمون گیاه توتون به‌عنوان گیاه معرف انتخاب شد. سوسپانسیونی از سلول تازه‌ی باکتری بیمارگر به غلظت 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه گردید و بین اپیدرم پایینی و بالای برگ توتون مایه‌زنی شد. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت ظهور

بررسی خصوصیات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها برای گروه‌بندی جدایه‌های غالب اپی‌فیت و جدایه‌های به دست آمده از آزمون آنتاگونیستی و همچنین جدایه عامل بیماری، آزمون‌های زیر انجام شد. در ابتدا محیط کشت‌های

به جدایه‌ها نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 انتخاب شد و فاصله ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش داده-های جفت شده غیروزنی (UPGMA) تعیین گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت و عامل آتشک در سه نوبت نمونه برداری بهار، تابستان و پاییز در مجموع ۸۰۰ پرگنه باکتری اپی‌فیت جداسازی شد. سه گروه باکتری غالب که جمعیت بالایی داشتند، برای شناسایی انتخاب شدند. این باکتری‌ها بر اساس آزمون‌های انجام شده (Schaad *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2002) به دو گروه گرم منفی شامل جنس-های *Pantoea* و *Pseudomonas* و گرم مثبت تفکیک شدند. نمونه بیمارگر و دارای علائم سوختگی هم با استفاده از آزمون-های انجام شده (Schaad *et al.* 2001) به‌عنوان *E. amylovora* در نظر گرفته شد (جدول ۱).

بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی‌فیت در شرایط آزمایشگاهی و شناسایی آنها

در فرآیند غربال باکتری‌های اپی‌فیت به دست آمده، جمعا ۸۶ جدایه توانستند هاله بازدارنده در برابر بیمارگر *E. amylovora* نشان دهند. قطر هاله بازدارندگی رشد از دو تا ۱۵ میلی‌متر در جدایه‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۱). بیشترین قطر بازدارندگی مربوط به جدایه سودوموناس از میزبان سیب در شهرستان مهاباد (Ps4) (جدول ۳) و کمترین قطر مربوط به جدایه پانتوا از میزبان گلایی در شهرستان محمدیار (Pa7) بود (جدول ۲).

نواحی نکروز در محل تزریق مورد بررسی قرار گرفت (Klement *et al.* 1964).

استخراج DNA ژنومی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های آنتاگونیست روی محیط کشت NA کشت داده شدند و پس از ۲۴-۴۸ ساعت سوسپانسیون از باکتری‌ها با غلظت 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر تهیه گردید. میکروتیوپ‌های حاوی سوسپانسیون، به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. سپس به مدت چهار دقیقه با دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی (DNA) به منظور استفاده در واکنش PCR ذخیره‌سازی شد (Schaad *et al.* 2001; Amirabad & Khodakaramian 2017).

انگشت نگاری با آزمون Rep-PCR

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از روش انگشت نگاری مولکولی Rep-PCR انجام شد. در این آزمون از آغازگر BOX1AR با توالی 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر آغازگر، ۹/۵ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز و دو میکرولیتر DNA باکتری انجام شد. چرخه حرارتی با واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه آغاز، با ۳۵ چرخه شامل واسرشت DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و امتداد در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه و در نهایت با یک چرخه‌ی نهایی در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. پنج میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل آگارز یک و نیم درصد به همراه مارکر 3Kbp در چاهک‌ها بارگذاری گردیدند. برای رنگ‌آمیزی ژل، از DNA-Green viewer استفاده گردید. سپس به مدت دو ساعت در ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شده و با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل عکس‌برداری شد (Versalovic *et al.* 1994).

تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی

ماتریس داده‌ها با بررسی عکس ژل‌های به دست آمده و تعیین فاصله یا شباهت ژنتیکی بین جدایه‌ها با اختصاص عدد یک در صورت وجود باند و عدد صفر در صورت عدم وجود باند، در نرم‌افزار اکسل تهیه شد. برای رسم دندروگرام ژنوتیپی مربوط

جدول ۱. آزمون‌های بیوشیمیایی و افتراقی برای شناسایی *Erwinia amylovora* و *P. agglomerans*، *Pseudomonas fluorescens*

Table 1. Biochemical and differential tests for identification of *Pseudomonas fluorescens*, *P. agglomerans* and *Erwinia amylovora*.

Character	<i>P. agglomerans</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. amylovora</i>
Gram	-	-	-
Levan	-	+	+
Yellow pigment on YDC	+	-	-
Grows at 41°C	+	-	-
Gas production from glucose	+	+	-
Gas production from maltose	+	-	-
Gas production from sucrose	+	+	+
Arginine dehydrogenase	+	+	-
Oxidase	-	+	-
Growth anaerobically	+	-	+
Fluorescent pigment on KB	-	+	-
Pectate degradation	-	-	-
Katalase	+	+	+
Green pigment on EMB	-	-	+
HR on Tobacco	-	-	+

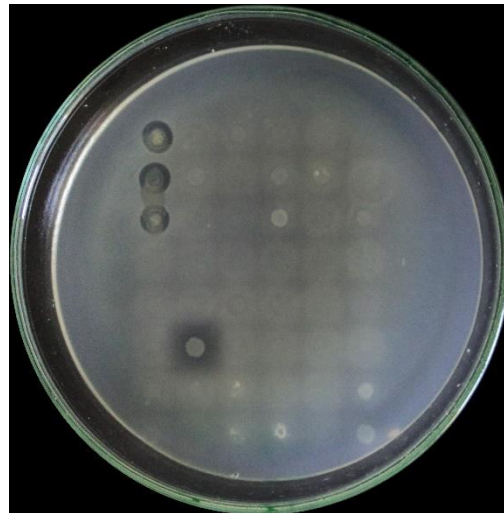
+ : Positive reaction or growth, - : negative reaction or no growth

می‌کنند و اخیراً PNP-1 محصول طبیعی از *P. ananatis* BRT175 گزارش شده که فعالیت بازدارندگی در مقابل باکتری عامل آتشک را دارا می‌باشد (Walterson & Stavrinides 2015).

انگشت نگاری با آزمون Rep-PCR

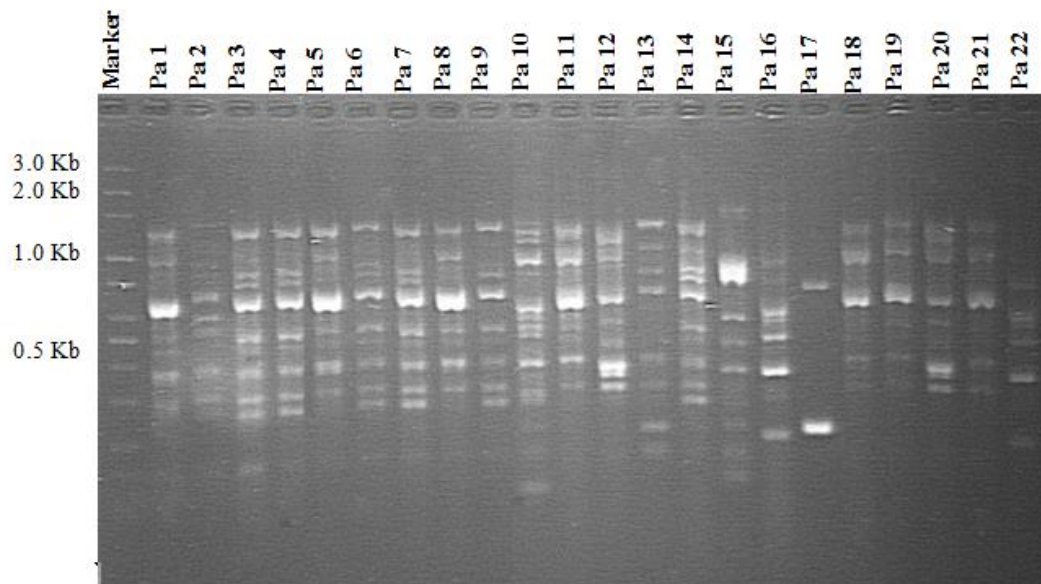
تکنیک‌های مولکولی بر پایه DNA ژنومی به‌طور گسترده جهت تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به کار می‌روند. آغازگر Box A1R برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های آنتاگونیست دو گروه *Pantoea* و *Pseudomonas* در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای Rep-PCR برای عناصر تکراری در ژنوم پروکاریوت‌ها طراحی شده‌اند و به عنوان یک نشانگر مؤثر برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان سویه‌های بسیار نزدیک، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Erdogan et al. 2011; Keshtkar et al. 2016).

جدایه‌های آنتاگونیست بر اساس شکل‌شناسی پرگنه‌ها و آزمون گرم در دو گروه گرم منفی شامل سویه‌های مولد رنگدانه سبز فلورسنت روی محیط کینگ بی و سویه‌های زرد رنگ و گروه باکتری‌های گرم مثبت دسته بندی شدند که ۴۳/۷۵ درصد مربوط به جدایه‌های فلورسنت، ۳۷/۵ درصد مربوط به جدایه‌های زرد رنگ و بقیه مربوط به گرم مثبت‌ها بودند. در نتیجه جدایه‌ها با آزمون‌های تفکیکی بیشتر در دو گروه گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها شامل *P. fluorescens* و *P. agglomerans* قرار گرفتند (جدول ۱). بعضی از جدایه‌های *Pantoea* تولید آنتی بیوتیک-هایی می‌کنند و در قالب محصولات تجاری نظیر BlightBan و C9-7 و Bloomtime Biological جهت کنترل آتشک درختان گلایی به بازار عرضه می‌شوند (van der Zwet et al. 2011). در حالی که بعضی هم پتانسیل زیست پالایی با گنجایش تجزیه علفکش‌ها بدون تولید محصولات جانبی سمی دارند. بسیاری از سویه‌های پانتوا تنوعی از محصولات طبیعی با خاصیت آنتی بیوتیکی نظیر پانتوسین، هربوکولین، میکروسین و فنازین تولید



شکل ۱. آزمون بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های اپیفیت و هاله اطراف جدایه‌ها.

Figure 1. Antagonistic ability of epiphytic bacteria and inhibition zone formed around isolates.



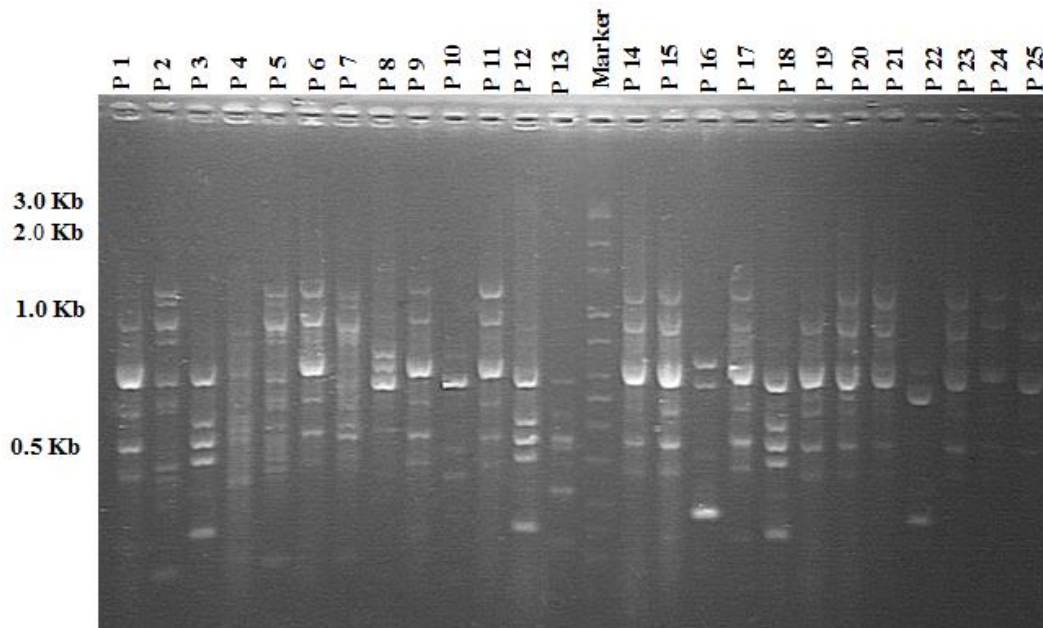
شکل ۲. نقوش الکتروفورز محصول PCR حاصل از آغازگر BOX A1R مربوط به جدایه‌های *Pantoea agglomerans* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

Figure 2. Electrophoresis pattern of PCR product obtained from BOX A1R primer for *Pantoea agglomerans* isolates on agarose gel 1.5%.

جدایه) و وزن مولکولی باندهای تکثیر شده می‌باشد. بیشترین باند تکثیر شده توسط این آغازگر ۱۴ باند برای جدایه‌های *Pseudomonas*، و ۱۱ باند برای جدایه‌های *Pantoea*، تشخیص داده شد. در مجموع تعداد باندهای به دست آمده توسط این آغازگر ۲۵ باند بود. اندازه باندها بین ۱۰۰ تا ۱۷۰۰ جفت باز برای جدایه‌های *Pseudomonas* و ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز برای جدایه‌های *Pantoea* متغیر بودند (شکل ۲ و ۳).

این نشانگر قابلیت تشخیص توالی‌های تکرار شونده در داخل ژنوم و تکثیر نواحی بین آنها را دارد و بر این اساس برای انگشت نگاری DNA جدایه‌های باکتری و تعیین میزان خویشاوندی آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این توالی‌های تکراری که به‌طور طبیعی در ژنوم باکتری پراکنده هستند، می‌توانند به‌عنوان جایگاه مناسبی برای تکثیر DNA ژنومی به‌کار روند (Rezzonico et al. 2009).

در استفاده از این نشانگر تفاوت جدایه‌ها در تعداد باندهای مشاهده شده (تعداد توالی‌های تکرار شونده در داخل ژنوم هر



شکل ۳. نقوش الکتروفورز محصول PCR حاصل از آغازگر BOX A1R مربوط به جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

Figure 3. Electrophoresis of PCR product obtained from BOX A1R primer for *Pseudomonas fluorescens* isolates on agarose gel 1.5%.

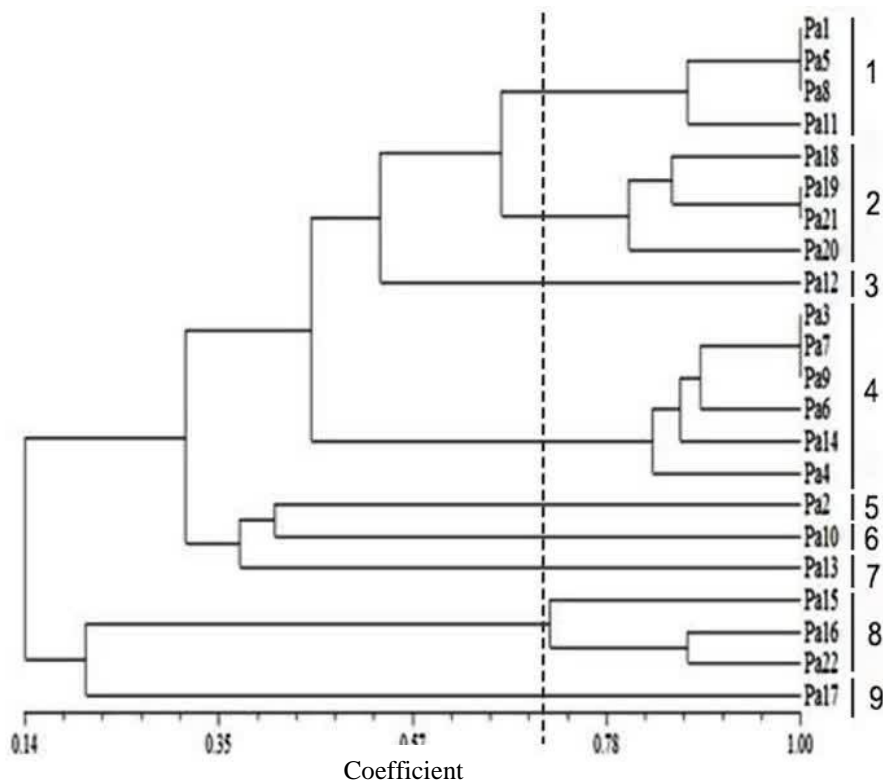
بالایی را در میان سویه‌های *P. fluorescence* توسط تجزیه و تحلیل RAPD نشان دادند. Mandal & Kotasthane (2012) نیز با استفاده از تجزیه و تحلیل RAPD سطوح بالای تنوع را در بین جدایه‌های *P. fluorescens* مشاهده کردند. (Erdogan *et al.* 2011) نیز با بررسی تنوع ژنوتیپی ۱۵ جدایه باکتری *P. fluorescens* به وسیله روش RAPD و تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی آنها، تنوع ژنتیکی بالایی را بین جدایه‌ها گزارش کردند. (Sarris *et al.* (2012) از کل ۱۸ جدایه *P. viridiflava* تعداد نه تا هجده باند از آغازگر Box-PCR و ۱۰ تا ۲۰ باند از آغازگر ERIC-PCR مشاهده کردند. همه جدایه‌ها در دو خوشه کاملاً مجزا طبقه‌بندی شد، که دو گروه ژنوتیپی وابسته به میزبان‌های مختلف بود. گروه ژنوتیپی اول شامل باکتری‌های جدا شده از گوجه‌فرنگی، بادمجان، هندوانه، کنگر و کنگرفرنگی بود در حالیکه گروه ژنوتیپی دوم شامل فقط جدایه‌های گیاه کرفس بود. در مطالعه انجام شده توسط Sarris *et al.* (2012) ارتباط بین گروه‌های ایجاد شده و میزبان مشخص بود. آنها همچنین نتیجه گرفتند که Box-PCR و ERIC-PCR قادر به تشخیص تغییرپذیری ژنتیکی در سطح داخل‌گونه‌ای بین جدایه‌های *P. viridiflava* هستند.

نتایج حاصل از واکنش Rep-PCR با استفاده از نرم افزار NTsys-pc 2.02e و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به روش داده‌های جفت شده غیر وزنی (Unweighted pair group method with arithmetic mean) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدایه‌های *P. agglomerans* در نهایت از مجموع ۲۲ جدایه با سطح شباهت ۷۰ درصد در نه گروه ژنوتیپی قرار گرفتند. ارتباطی بین گروه‌های ژنوتیپی با منطقه جغرافیایی و همچنین خاصیت آنتاگونیستی در بین جدایه‌های پانتوا مشاهده نشد (جدول ۲ و شکل ۴). مطالعات ژنتیک جمعیت این باکتری-ها جهت اهداف اپیدمیولوژیکی و برای شناسایی سویه‌هایی با مشخصات مهم نظیر توان آنتاگونیستی و تولید آنتی‌بیوتیک و سایر مطالعات زیستی ضروری می‌باشد (Deletoile *et al.* 2009). برای جدایه‌های مربوط به *P. fluorescens* هم بر اساس دندروگرام به دست آمده با سطح تشابه ۷۵ درصد، از مجموع ۲۵ جدایه مورد بررسی، ۱۰ گروه ژنوتیپی در میان آنها بروز پیدا کرد. جدایه Ps4 مربوط به منطقه مهاباد از میزبان سیب می‌باشد که در این دندروگرام در یک خوشه جداگانه قرار گرفت و بیشترین تفاوت را با بقیه جدایه‌ها داشت (جدول ۳ و شکل ۵). ارتباطی بین گروه‌های ژنوتیپی ایجاد شده و مناطق جغرافیایی در بین جدایه‌ها مشاهده نگردید. (Kumar *et al.* (2002) تنوع ژنتیکی

جدول ۲. گروه‌بندی، مناطق و میزبان جدایه‌های پانتوآهای آنتاگونیست از استان آذربایجان غربی.

Table 2. Grouping, geographical areas and hosts of antagonist *Pantoea* isolates from West Azerbaijan province.

Region	Hosts	isolate code	Group number
Nagadeh, Salmas, Oshnavieh, Mohamadyar	Apple (2), pear, quince	Pa1, Pa5, Pa8, Pa11	1
Khoy (2), Oshnavieh(2)	Apple (3), quince (1)	Pa18, Ppa19, Pa21, Pa20	2
Orumieh	Pear	Pa12	3
Nagadeh (1), Oshnavieh (3), Mohamadyar (2)	Apple (2), pear (1), quince (3)	Pa3, Pa7, Pa9, Pa6, Pa14, Pa4	4
Salmas	Quince	Pa2	5
Nagadeh	Pear	Pa10	6
Salmas	Quince	Pa13	7
Orumieh (1), Nagadeh (1), Mahabad (1)	Pear (1), Apple (2)	Pa15, Pa16, Pa22	8
Nagadeh	Apple	Pa17	9



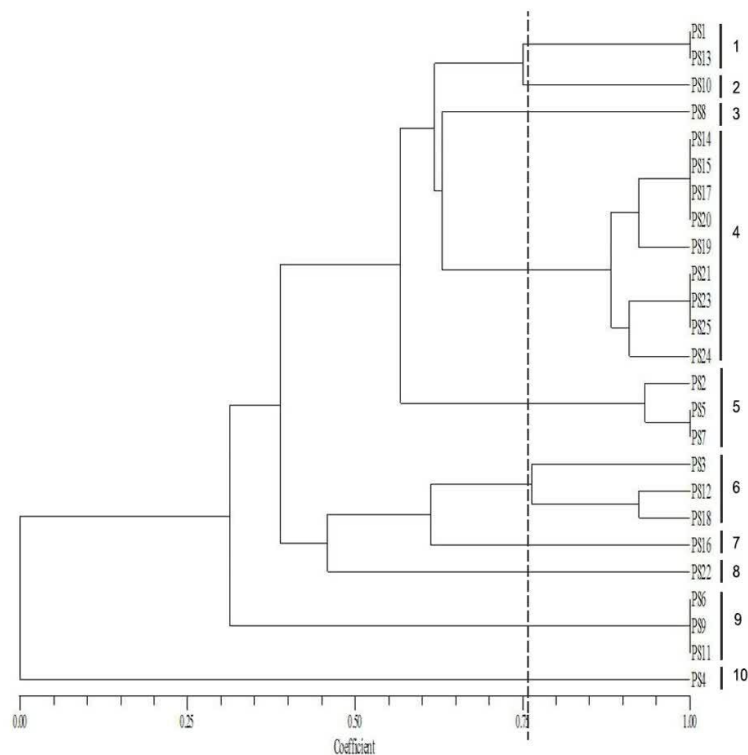
شکل ۴. دندروگرام خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌های *Pantoea agglomerans* با آغازگر BOX A1R رسم شده توسط نرم افزار NTsys- pc 2.02.

Figure 4. Dendrogram of genotypic characteristics of *Pantoea agglomerans* isolates using BOX A1R primer designed by NTsys-pc 2.02 software.

جدول ۳. گروه‌بندی، مناطق و میزبان جدایه‌های سودوموناس‌های آنتاگونیست از استان آذربایجان غربی.

Table 3. Grouping, geographical areas and hosts characteristics of antagonistic pseudomonad isolates from West Azerbaijan province.

Region	Hosts	isolate code	Group number
Mahabad, Miandoab	Apple	Ps1, Ps13	1
Oshnavieh	Apple	Ps10	2
Nagadeh	Apple	Ps8	3
Nagadeh (2), Oshnavieh (3), Mohamadyar (2), Salmas (1), Mahabad (1)	Apple (2), pear (1), quince (3)	Ps14, Ps15, Ps17, Ps20, Ps19, Ps21, Ps23, Ps25, Ps24	4
Mohamadyar	Apple, Pear (2)	Ps2, Ps5, Ps7	5
Miandoab, Mohamadyar (2)	Pear, Apple (2)	Ps3, Ps12, Ps18	6
Nagadeh	Pear	Ps16	7
Nagadeh	Apple	Ps22	8
Nagadeh, Oshnavieh (2)	Apple, Pear, Quince	Ps6, Ps9, Ps11	9
Mahabad	Apple	Ps4	10



شکل ۵. دندروگرام خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* با استفاده از آغازگر BOX A1R رسم شده توسط نرم‌افزار NTsys-pc 2.02.

Figure 5. Dendrogram of genotypic characteristics of *Pseudomonas fluorescens* isolates using BOX A1R primer designed by NTsys-pc 2.02 software.

رده‌بندی آنها مورد استفاده قرار گیرد. روش مولکولی Rep-PCR همچنین برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xanthomonas* مورد استفاده قرار گرفته و نتایج نشان داده که این روش جهت شناسایی تنوع ژنتیکی بین سویه‌ها و همچنین مطالعه رده‌بندی مفید است (Guanghai *et al.* 2002). Haiyun (2011) *et al.* نیز از Rep-PCR و Box-PCR جهت مطالعه تنوع ژنتیکی *Ralstonia solanocearum* استفاده کردند و بر اساس انگشت نگاری ژنومی، ۱۹ باند اختصاصی در Box-PCR تکثیر شد. آنها با تجزیه و تحلیل خوشه نشان دادند که تنوع ژنتیکی *R. solanocearum* مرتبط با منشأ جغرافیایی و گیاهان میزبان بود. گیاهان میزبان مختلف نقش عمده‌ای در تفاوت ژنتیکی *R. solanocearum* داشتند. (Singh *et al.* 2015) نیز با بررسی ۲۸ جدایه *X. campestris* pv. *campestris* با استفاده از Rep-PCR سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را مشاهده کردند. آنها بیشترین محصول PCR را در Box-PCR مشاهده کردند و برای تغییرپذیری ژنومی، الگوی بانندی مختلفی را در بین جدایه‌های میزبان‌های مختلف کلمیان، در مناطق شمالی هند نشان دادند. در این بررسی ارتباط ناچیزی بین گروه‌های ژنوتیپی و آنتاگونیست‌ها مشاهده گردید. همچنین الگوی بانندی در بین جدایه‌های میزبان‌های نمونه برداری شده در دو گروه آنتاگونیست متفاوت بود و ارتباطی بین آنها مشاهده نشد. در آینده پیشنهاد می‌شود مطالعات مولکولی و میدانی گسترده‌تری روی باکتری‌های اپی‌فیت میزبان‌های مختلف از جمله سایر گیاهان خانواده رزاسه به منظور شناسایی دقیق‌تر آنها و دستیابی به راه‌های مدیریتی بهتر آتشک گلابی از جمله مهار زیستی، انجام پذیرد.

توانایی Rep-PCR برای تصویربرداری کل ژنوم باکتریایی، آن را جهت تجزیه و تحلیل داخل‌گونه‌ای جمعیت ایده‌آل ساخته و برای بسیاری از گونه‌ها نیز توصیف شده است (Xie *et al.* 2008). تغییر و تنوع در گروه‌ها و جمعیت‌های باکتری‌های آنتاگونیست می‌تواند به علت تغییرات ژنوتیپی (شامل جهش، نوترکیبی در محتوای ژنومی در پاسخ به شرایط محیطی) و یا مهاجرت از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد. ساختمان تشکیل دهنده یک جمعیت می‌تواند به میزان تنوع ژنوتیپی درون یک جمعیت، ارتباط‌های فیلوژنی درون یا بین گروه‌های جمعیتی و یا تغییرات جزئی در زمان و مکان وابسته باشد (Mandal & Kotasthane 2012). (Teixeira *et al.* 2009) با بررسی ۴۲ سویه *E. psidii* توسط Rep-PCR از مناطق جغرافیایی مختلف نشان دادند که جمعیت‌های این باکتری در برزیل در سطح تنوع ژنتیکی پایینی قرار دارند. آنها ارتباطی بین گروه‌های Rep-PCR و محل منشأ، سال جمع‌آوری و بیماری‌زایی مشاهده نکردند. تجزیه تحلیل Rep-PCR همچنین همگنی بین جدایه‌های *E. amylovora* مرتبط با درختان میوه (سیب و گلابی) از مناطق مختلف جغرافیایی را نشان داد (Darvishnia *et al.* 2020; McManus & Jones, 1995). LiNa *et al.* (2016) نیز از Rep-PCR جهت تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی دوازده جدایه *Lysobacter* استفاده کردند. آنها با استفاده از Box-PCR و ERIC-PCR، به ترتیب تعداد ۱۱ و ۱۷ انگشت‌نگاری مولکولی متفاوت با باندهای دامنه ۲۵۰ تا ۷۰۰ جفت‌باز برای دوازده جدایه *L. capsici* و *L. enzymogenes* و *L. antibioticus* نشان دادند و به این نتیجه رسیدند که این روش می‌تواند جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف این باکتری، شناسایی و

References

- Bringel F, Couee I, 2015. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Frontiers in Microbiology* 6 (486): 1–14.
- Carmona-Hernandez S, Reyes-Perez JJ, Chiquito-Contreras RG, Rincon-Enriquez G, Cerdan-Cabrera CR, *et al.*, 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. *Agronomy* 9 (121): 1–15.
- Darvishnia M, Mirzaei-najafgholi H, Aeni M, Joshaghani A, 2020. Identification and genotypic characteristics of *Erwinia amylovora* isolates, the causal agents of fire blight on pome fruit trees in Hamadan province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 43 (4): 1–18 (in Persian with English abstract).
- Dawson SL, Fry JC, Dancer BN, 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for diversity of fluorescent pseudomonads. *Journal of Microbiological Methods* 50(1): 9–22.
- Deletoile A, Decre D, Courant S, Passet V, Audo J, *et al.*, 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 300–310.
- Dias M, Miguel MG, Durate WF, Silva CF, Schwan RF, 2015. Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic

- activity potential. *Annual Microbiology* 58: 83–103.
- Dukare AS, Paul S, Nambi VE, Gupta RK, Singh R, *et al.*, 2018. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 16: 1–16.
- Erdogan O, Ikten H, Baysal O, 2011. Molecular Diversity Within *Pseudomonas fluorescens* Strains Reflects Their Antagonistic Effect Differentiations to *Verticillium dahliae* on Cotton. *Romanian Biotechnological Letters* 16(4): 6412–6418.
- Fahy PC, Persley CJ, 1983. Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide. Academic Press Sidney. Australia. 393 pp.
- Geider K, Jakovljevic V, Mohammadi M, Jock S, 2005. Characterization of epiphytic bacteria from Australia and Europe as possible fire blight antagonists. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases*, 1st Symposium., Darmstadt, Germany. p. 245–248.
- Guang-Hai J, Zhi-Gang X, Shi-Guang Z, 2002. Preliminary Analysis of Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and *Xanthomonas leersiae* Stains in China by Rep-PCR. *Acta Phytopathologica Sinica* 32 (1): 26–32.
- Haiyun L, Jianmei C, Bo L, Xuefang Z, Rongfeng X, 2011. Genetic diversity analysis of *Ralstonia solanacearum* based on BOX-PCR and REP-PCR. *Journal of Agriculture Biotechnology* 19 (6):1099–1109.
- Hakim Rabet S, Ketabchi S, 2021. The effect of compost fertilizers, vermicompost and their tea on bacterial vascular wilt and growth indices in tomato seedlings. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9(4): 61–74.
- Hugh R, Leifson E, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by versus gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66 (1): 24–26.
- Johnson KB, Sawyer TL, Stockwell VO, Temple TN, 2009. Implications of Pathogenesis by *Erwinia amylovora* on Rosaceous Stigmas to Biological Control of Fire Blight. *Phytopathology* 99 (2):128–138.
- Kado CI, 2010. Plant Bacteriology. APS Press, New York. 336 pp.
- Keshkar AR, Khodakaramian G, 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.
- Klement Z, Farkas GL, Loverkovich H, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474–477.
- Kovacs N, 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703–708.
- Kumar R, Thirumali N, Arasu V, Gunasekaran P, 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science* 82 (12): 1463–1466.
- Lelliott RA, Stead DE, 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial disease of plants. Blackwell Scientific Publication. Oxford. Boston.
- Lina F, Haiyan Z, Xiaofang Z, Lanfang W, Jinhao Z, *et al.*, 2016. Genetic diversity analysis of rep-PCR genomic fingerprinting of *Lysobacter* spp. *African Journal of Microbiology Research* 10(34): 1388–1396.
- Lornzini M, Zapparli G, 2020. Epiphytic bacteria from withered grapes and their antagonistic effects on grape-rotting fungi. *International Journal of Food Microbiology* 319:108505.
- Manceau C, Lalamde JC, Lachaud G, 1990. Bacterial colonization of flowers and leaf surface of pear tree. *Acta Horticulture* 273: 73–81.
- Mandal L, Kotasthane AS, 2012. Genetic Diversity Analysis of the *Pseudomonas fluorescent* Isolates in Chhattisgarh Region of India. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6 (3): 1481–1484.
- Mcmanus PS, Jones AL, 1995. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology* 85: 1547–1553.
- Mina D, Pereira JA, Linoneto T, Baptista P, 2020. Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microbial Ecology* 80(1):145-57.
- Ming X, Huaqun Y, Yi L, Jie L, Xueduan L, 2008. Repetitive sequence-based polymerase chain reaction to differentiate close bacteria strains in acidic sites. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18: 1392–1397.
- Moradi-Amirabad Y, Khodakaramian G, 2017. Isolation and characterization of *Erwinia piriflorinigrans* causal agent flower necrosis of red poppy. *Australasian Plant Pathology* 46: 611–616.
- O'brien PA, 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology* (46): 293–304.

- Petruta CC, Catalina V, Matilda C, Sorina D, Manuela C, *et al.*, 2008. In vitro inhibition of *Erwinia amylovora* Romanian isolates by new antagonistic bacterial strains. *Plant Pathology* 29: 120–128.
- Pusey PL, Stockwell VO, Mazzola M, 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99: 571–581.
- Rezzonico F, Smits TH, Montesinos E, Frey JE, Duffy B, 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology* 9 (204): 1–18.
- Sammer UF, Volksch B, Mollmann U, Schmidtke M, Spiteller M, *et al.*, 2009. 2-Amino-3-(oxirane-2,3-dicarboxamido)-propanoyl-valine, an effective peptide antibiotic from the epiphyte *Pantoea agglomerans* 48b/90. *Applied Environmental Microbiology* 75: 7710–7717.
- Sarris PF, Trantas EA, Mpalantinaki E, Ververidis F, Goumas DE, 2012. *Pseudomonas viridiflava*, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level. *PLoS ONE* 7 (4): 1–12.
- Schaad NW, Jones JB, Chun C, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Aps press, New York. 397 pp.
- Singh D, Rathaur PS, Singh A, Raghuwanshi R, 2015. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated from Brassica crops using RAPD and Rep-PCR. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 85 (6): 792–796.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M, 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917–928.
- Texeira ACO, Marques ASA, Ferreira MASV, 2009. Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 678–684.
- Van Der Zwet T, Orolazahalbrendt N, Zeller W, 2011. Fire Blight: History, Biology and Management. APS Press, St Paul, MN, USA. 421 pp.
- Versalovic J, Schneider M, Debruijn FJ, Lupski JR, 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction-Methods. *Molecular and Cell Biology* 5: 25–40.
- Walterson AM, Stavrinides J, 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 968–984.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)