



دانشگاه گوارزی و منابع گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیستم، شماره سوم، ۱۳۹۲

<http://jopp.gau.ac.ir>

شناسایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در چند استان شمالی و مرکزی ایران

*واله عباسی^۱، حشمت‌اله رحیمیان^۲ و محمدعلی تاجیک‌قنبری^۳

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

آستاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

آستادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۲

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران با عامل *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) یکی از بیماری‌های شایع درختان میوه هسته‌دار در استان‌های شمالی و مرکزی ایران می‌باشد. به منظور شناسایی جدایه‌های عامل بیماری، طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹، ۱۰۵ جدایه به‌دست آمده از باغ‌های درختان میوه هسته‌دار واقع در مناطق مختلف استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گیلان، مازندران، خراسان رضوی، تهران و قزوین از نظر فنوتیپی، بیماری‌زایی و الکتروفورز پروتئین‌های سلولی و وجود ژن سرینگومایسین (*syfB*) مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و الگوی پروتئین‌های سلولی اختلاف‌های جزئی نشان دادند. همه جدایه‌ها روی هلو دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی بودند و از این نظر مشابه به نظر رسیدند. همه جدایه‌ها به همراه جدایه‌ی استاندارد، قطعه ۷۵۲ جفت بازی با آغازگر *syfB* را تکثیر کردند. تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها با دو روش BOX-PCR و IS50-PCR بررسی شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به‌دست آمده نشان داد که در BOX-PCR در سطح تشابه ۷۳ درصد، جدایه‌ها به ۹ گروه و با IS50-PCR به ۸ گروه و با ترکیب همه آغازگرها به ۱۱ گروه تقسیم شدند. بین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها و منشأ جغرافیایی آن‌ها ارتباط

*مسئول مکاتبات: valeh.abasi@gmail.com

معنی‌داری وجود نداشت. نتایج نشانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جدایه‌های مختلف Pss عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار بود. در این بررسی ارتباط مشخصی بین منشأ جغرافیایی جدایه‌ها و گروه‌های به‌دست آمده از بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: شانکر باکتریایی هسته‌داران، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، تنوع ژنتیکی، IS50-PCR، BOX-PCR

مقدمه

بیماری شانکر باکتریایی که به وسیله پاتووارهای *Pseudomonas syringae* ایجاد می‌شود، یکی از مشکلات جدی و محدودکننده باغ‌های میوه هسته‌دار محسوب می‌شود (سولیکوسکا و سویوزوسکی، ۲۰۰۸). باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) می‌تواند در بیش از ۱۸۰ گونه‌ی گیاهی از چندین جنس غیر وابسته به هم بیمارزا باشد (بردبوری، ۱۹۸۶) و به درختان هسته‌دار مانند هلو، شلیل، آلو، گیلاس، زردآلو و بادام خسارت قابل توجهی در حد ۷۵-۱۰ درصد بزند و عامل بیماری‌های متعددی روی محصولات زراعی و باغی می‌باشد (اگریوس، ۲۰۰۵). از عمده‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط این پاتووار می‌توان به شانکر باکتریایی درختان زردآلو (بهار و همکاران، ۱۹۸۵)، شانکر درختان گیلاس (بناپور و همکاران، ۱۹۹۰)، بلایت گندم و جو (رحیمیان، ۱۹۸۹) و نوار قرمز نیشکر (رحیمیان، ۱۹۹۴) اشاره کرد.

بررسی تنوع ژنتیکی یک میکروارگانیزم می‌تواند به مطالعه‌ی رده‌بندی، اپیدمیولوژی و ردیابی آن کمک کند (مایلگروم و فرای، ۱۹۹۷) و در برنامه‌های اصلاح نباتات جهت پژوهش در زمینه تولید گونه‌های گیاهی متحمل یا مقاوم به بیماری مفید واقع گردد (نورلی و همکاران، ۱۹۸۴).

در دو دهه اخیر با گسترش استفاده از روش‌های مولکولی، تشخیص و طبقه‌بندی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی دچار دگرگونی شده است و براساس توالی‌های کاملاً حفظ شده، نیمه حفظ شده و کاملاً متغیر باکتریایی آغازگرهایی طراحی شده‌اند که در تشخیص کاربرد دارند (هایوارد، ۱۹۹۶). توالی‌های تکراری DNA که به‌طور طبیعی در ژنوم باکتری‌ها پراکنده هستند، می‌توانند به‌عنوان جایگاهی برای تکثیر DNA ژنومی به‌کار روند (ورسالویک و همکاران، ۱۹۹۴). سه گروه از توالی‌های تکراری REP (repetitive extragenic palindromic)، ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)

و BOX با جزییات بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. با طراحی آغازگرهایی بر اساس این توالی‌های تکراری متمم‌هایی تحت عنوان REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR (rep-PCR) ارایه شده‌اند که منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنوم می‌شود و الگوی ژنومی به دست آمده از این روش‌ها باعث تولید و تمایز قطعاتی با اندازه‌های مختلف DNA ژنوم اختصاصی جدایه می‌گردد که به عنوان بارکد برای هر جدایه خاص به کار می‌رود (لوز و همکاران، ۱۹۹۴). توالی‌های BOX دارای ۱۵۴ جفت نوکلئوتید می‌باشند که تقریباً ۲۵ بار در ژنوم تکرار می‌شوند و شامل سه زیرواحد ۵۹ نوکلئوتیدی BOXa، ۴۵ نوکلئوتیدی BOXb و ۵۰ نوکلئوتیدی BOXc می‌باشند. توالی‌های BOX در نواحی بین ژنومی قرار گرفته‌اند و توانایی تشکیل ساختار لوپ را داشته و هیچ ارتباطی با توالی‌های ERIC و REP ندارند. توالی‌های BOX اولین بار در ژنوم باکتری‌های گرم منفی کشف شدند که تقریباً ۳۰ تا ۱۵۰ بار در ژنوم باکتری تکرار می‌شوند (ورسالویک و همکاران، ۱۹۹۴). توالی‌های الحاقی Insertion sequences (IS) از خانواده‌های مختلف به عنوان توالی‌های DNA متحرک در ژنوم باکتری‌ها و دیگر موجودات زنده گسترده هستند (برگ و هو، ۱۹۸۹). عناصر IS در مطالعات تنوع ژنتیکی، نوآرایی ژنومی و انعطاف‌پذیری ژنوم باکتری‌ها به عنوان نشانگرهای DNA مورد استفاده قرار گرفته‌اند (ماهیلون و چاندلر، ۱۹۹۸). IS50 از ترانسپوزان *Tn5* به عنوان آغازگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در چندین جنس باکتریایی نظیر سودوموناس‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (وینگارت و ولکش، ۱۹۹۰).

این پژوهش با هدف شناسایی، ارزیابی بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف PSS عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار با استفاده از روش‌های BOX-PCR و IS50-PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌ها: بین سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰ از برخی باغ‌های درختان میوه هسته‌دار (هلو، شلیل، زردآلو، گیلاس و آلو) واقع در مناطق مختلف استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گیلان، مازندران، خراسان رضوی، تهران و قزوین نمونه‌برداری صورت گرفت. از درختان دارای علائم لکه برگی و شانکر باکتریایی، نمونه‌هایی از بافت‌های آلوده‌ی برگ، تنه، شاخه و سرشاخه

جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه برای جداسازی باکتری، برگ‌های دارای علائم لکه برگ‌ی نکروزه و شاخه‌های دارای شانکر ابتدا زیر جریان آب معمولی و سپس دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس از حدفصل بافت سالم و آلوده برگ و حاشیه شانکر روی شاخه قطعات ۱-۲ سانتی‌متری جدا و در تشتک‌های پتری بوسیله تیغ اسکالپل سترون خرد گردیده و چند قطره آب مقطر سترون به آنها اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه، یک لوپ از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی برداشته و روی محیط کشت آگار غذایی دارای ۵ درصد سوکروز (NAS) Nutrient Agar Sucrose به صورت مخطط کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تک پرگنه‌های به رنگ کرم مایل به زرد و محدب انتخاب و مجدداً روی محیط آگار غذایی خالص گردیدند (رادماکر و همکاران، ۲۰۰۰). مشخصات مربوط به جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای: آزمون اکسیداز به روش کوکس (کوکس، ۱۹۵۶)، واکنش گرم، تولید رنگدانه فلورسنت، فعالیت کاتالاز، آزمون LOPAT (تولید لوآن، اکسیداز، فعالیت پکتولیتیکی، تولید آرژنین‌دی‌هیدرولاز و واکنش فوق‌حساسیت روی توتون و شمعدانی)، آزمون GATTa (ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، مصرف تارتارات و فعالیت تیروزیناز)، هیدرولیز آربوتین، نشاسته و توئین ۸۰، رشد هوازی/ بی‌هوازی، تولید اوره‌آز، احیای نیترات، رشد در نمک طعام ۵ درصد، رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و آزمون توانایی استفاده از برخی منابع هیدروکربنی به روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار.

شماره جدایه (Strain)	میزبان (Host)	محل جمع‌آوری (Location collected)
A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8,A9,A10	هلو (Peach)	اردبیل- مغان (Ardebil – Moghan)
A11,A12,A13	..	اردبیل- مشکین شهر (Ardebil – Meshkinshahr)
Az1,Az2,Az3,Az4	..	آذربایجان شرقی - اهر (Eastern Azarbaijan – Ahar)
Az5,Az6,Az7	..	آذربایجان شرقی- شبستر (Eastern Azarbaijan –Shabestar)
T1,T2,T3,T4	..	تهران- شهریار (Tehran – Shahriar)
Kh1,Kh2,Kh3,Kh4	..	خراسان رضوی- نیشابور (Khorasan – Neyshabour)
A14,A15,A16	شلیل (Nectarine)	اردبیل- مغان (Ardebil – Moghan)
A17,A18,A19,A20	..	اردبیل- مشکین شهر (Ardebil – Meshkinshahr)
M1,M2,M3,M4,M5	..	مازندران- ساری (Mazandaran – Sari)
A21,A22,A23	زردآلو (Apricot)	اردبیل- مشکین شهر (Ardebil – Meshkinshahr)
Az8,Az9	..	آذربایجان شرقی - اهر (Eastern Azarbaijan – Ahar)
Az10,Az11,Az12	..	آذربایجان شرقی - کلبر (Eastern Azarbaijan – Kaleybar)
T5,T6,T7,T8	..	تهران- شهرستانک (Tehran – Shahrestanak)
Kh5,Kh6,Kh7,Kh8,Kh9	..	خراسان رضوی - سبزوار (Khorasan – Sabzevar)
Gh1,Gh2,Gh3,Gh4	..	قزوین - تاکستان (Qazvin – Takistan)
A24,A25,A26,A27	گیلاس (Sweet cherry)	اردبیل- مشکین شهر (Ardebil-Meshkinshahr)
Az13,Az14	..	آذربایجان شرقی - اهر (Eastern Azarbaijan – Ahar)
Az15,Az16,Az17,Az18,Az19,Az20	..	آذربایجان شرقی - شبستر (Eastern Azarbaijan – Shabestar)
G1,G2,G3,G4,G5	..	گیلان- تالش (Guilan – Talesh)
Gh5,Gh6,Gh7,Gh8,Gh9,Gh10	..	قزوین- الموت (Qazvin – Alamut)
A28,A29,A30	آلو (Plum)	اردبیل- مغان (Ardebil – Moghan)
Az21,Az22	..	آذربایجان شرقی - اهر (Eastern Azarbaijan – Ahar)
Az23,Az24,Az25	..	آذربایجان شرقی - شبستر (Eastern Azarbaijan – Shabestar)
G6,G7,G8,G9,G10	..	گیلان- آستارا (Guilan – Astara)
T9,T10,T11	..	تهران- دماوند (Tehran – Damavand)
M6,M7,M8,M9,M10	..	مازندران- نکا (Mazandaran – Neka)
Pss141	هلو (Peach)	مؤسسه میکروبیولوژی برزیل - برازیلیا (BMC)

آزمون بیماری‌زایی: آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های هلوی سه ماهه (رقم Loring) بر اساس روش لیتل و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط KB، سوسپانسیون با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر (بر اساس کدورت‌سنجی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد. سپس با استفاده از سرنگ انسولین مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به زیر پوست ساقه گیاهچه‌های هلوی تزریق گردید. تزریق سوسپانسیون هر جدایه به سه نقطه گیاهچه هلوی انجام شد. از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد استفاده شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری شدند. این آزمون در اواسط فصل بهار انجام شد. بعد از گذشت ۱۰ روز گیاهچه‌های هلوی از نظر بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور بر اساس سرعت توسعه بیماری و شدت علائم، از ۴ درجه یا مقیاس (نمره صفر تا ۳) استفاده شد (لیتل و همکاران، ۱۹۹۸). برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، میانگین و انحراف معیار داده‌های به‌دست آمده برای همه جدایه‌ها محاسبه گردید.

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی: الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌اکریل آمید با استفاده از سیستم ناپیوسته لملی (لملی، ۱۹۷۰) با تغییرات مختصری (رحیمیان، ۱۹۹۴) صورت گرفت. الکتروفورز در شدت جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ برم فنل بلو به انت‌های ژل انجام شد، سپس ژل در محلول ۰/۱ درصد کومازی بلو (آب، اسیداستیک، متانول به نسبت ۵۰:۵۰:۱۰) و ۰/۱ گرم کومازی بلو) به مدت ۳ ساعت رنگ‌آمیزی و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در همان محلول ولی بدون رنگ کومازی بلو رنگ‌بری انجام شد و جهت نگهداری به اسیداستیک ۷ درصد منتقل گردید.

استخراج DNA ژنومی: جداسازی DNA ژنومی به روش لیز قلیایی سلول‌های باکتریایی انجام شد (عربی و همکاران، ۲۰۰۶). از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها، سوسپانسیون در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. به‌منظور لیز شدن سلول‌ها، به اندازه ۰/۱ حجمی KOH ۳ درصد به هر سوسپانسیون اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه لیز شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس لایه رویی به‌عنوان DNA از لوله‌ها برداشته و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای حصول اطمینان از وجود DNA خالص در نمونه‌های خالص‌سازی شده، ۵ میکرولیتر از DNA فوق همراه با یک میکرولیتر محلول برم فنول بلو در سوکروز روی مینی ژل آگاروز به غلظت

یک درصد در ۷۰ ولت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. وجود یک باند با وزن مولکولی بالا و بدون کشیدگی در طول ژل به عنوان معیار مناسب بودن کیفیت DNA تلقی گردید. ردیابی ژن سرینگومایسین (*syfB*): برای این منظور از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دو آغازگر اختصاصی (5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3' B1 و 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3' B2 مطابق با روش سورنسن و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل ۱/۵ درصد آگارز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت یک ساعت انجام شد. ژل پس از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید (یک میلی گرم در لیتر) زیر نور UV مشاهده و عکسبرداری شد. وجود یک باند ژنی با وزن مولکولی ۷۵۲ جفت‌بازی و بدون کشیدگی نشانگر وجود ژن *syfB* می‌باشد.

BOX-PCR و IS50-PCR: آغازگرهای BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT -3' (ورسلویک و همکاران، ۱۹۹۴) و IS50 (5'-CAG GAC GCT ACT TGT GT-3' (آلریچ و همکاران، ۱۹۹۳) تهیه شده از شرکت سیناژن مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۲۳ میکرولیتر محلول پایه (۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، بافر PCR(1X) (سیناژن)، ۱/۵ میلی مولار محلول کلرید منیزیم، ۲/۵ واحد پلیمرز تک و ۱۷/۷ میکرولیتر آب مقطر سترون) به علاوه ۲ میکرولیتر از DNA نمونه بود که با یک قطره روغن معدنی برای جلوگیری از تبخیر پوشانده شد.

برنامه دمایی برای BOX-PCR (ورسلویک و همکاران، ۱۹۹۴) به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۴ چرخه با برنامه ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و برنامه دمایی برای IS50-PCR (وینگارت و ولکش، ۱۹۹۷) به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۳۸ درجه سانتی گراد و ۳/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری

شدند. از دستگاه ترموسایکلر (Personal thermocycler, Eppendorf, Germany)، جهت تکثیر استفاده گردید.

الکتروفورز محصولات PCR: الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه یک نشانگر مولکولی (100 bp DNA-Ladder، شرکت Fermentas) انجام شد. از بافر TBE(1X) جهت الکتروفورز استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت الکتروفورز شدند. ژل سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (یک میلی‌گرم در لیتر) رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر، در دستگاه ژل داکيومنت مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی: بعد از به‌دست آمدن انگشت‌نگاری ژنومی BOX-PCR و IS50-PCR بر اساس وجود و یا عدم وجود باند، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار ان تی سیس، نسخه ۲/۰۲ (رولف، ۱۹۹۰) ترسیم گردید. از ضریب تشابه جاکارد برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش داده‌های جفت شده غیروزنی (UPGMA)، جهت ترسیم درخت فیلوژنی و آنالیز خوشه‌ای داده‌ها استفاده شد. برای به‌دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر و با ثبات‌تر، آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده از دو روش یادشده به صورت ترکیبی نیز انجام شد. برای به‌دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر، کارایی روش‌های مختلف تجزیه کلاستر به کمک ضریب همبستگی کوفنتیک (فاریس، ۱۹۶۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. ضریب کوفنتیک بالاتر نشانگر مناسب‌تر بودن روش خوشه‌بندی تلقی گردید (سوکال و رولف، ۱۹۶۲؛ اسنیز و سوکال، ۱۹۷۳).

نتایج

جداسازی: در این بررسی ۱۰۵ جدایه از نمونه‌های آلوده شاخه و برگ درختان میوه هسته‌دار با خصوصیات مشابه پاتووار PSS جداسازی شد.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها: پرگنه جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی مدور، به رنگ کرم مایل به زرد، لزج و برآمده و روی محیط YDC کرم رنگ و غیر لزج بود. حاشیه پرگنه در برخی از جدایه‌ها صاف و در برخی نیز کمی موج‌دار بود. جدایه‌ها بعد از ۴۸ ساعت کشت روی محیط KB تولید رنگدانه فلورسنت کردند. آزمون گرم در همه جدایه‌ها منفی بود. تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون بودند. جدایه‌ها هوازی اجباری بوده و تولید لوان، کاتالاز، هیدرولیز

ژلاتین، اسکولین، آربوتین و توئین ۸۰ در همه آنها مثبت بود. تولید اکسیداز، اوره‌آز، آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز کازئین، احیای نترات، تولید ایندول و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی در همه جدایه‌ها منفی بود.

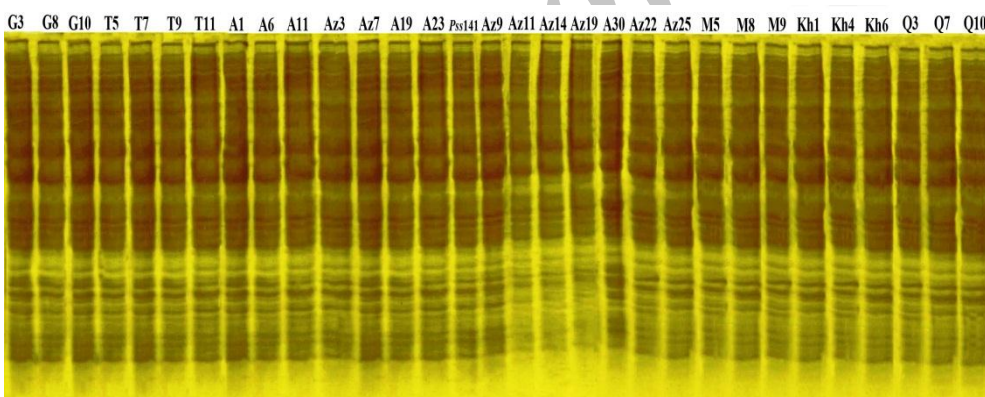
جدایه‌ها قادر به تولید H_2S از پیتون، گاز از گلوکز و لسیتیناز و رشد در دماهای بیشتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد نبودند. قابلیت هیدرولیز نشاسته در همه جدایه‌ها منفی بود. جدایه‌ها توانایی تحمل نمک طعام ۵ درصد را داشتند ولی نتوانستند روی محیط نمک طعام ۶ درصد رشد کنند. جدایه‌ها قادر به تولید اسید از گلوکز، فروکتوز، سوربیتول، مانوز، گالاکتوز، سوکروز، زیلوز، آرابینوز، مالتوز، اینوزیتول، مانیتول، گلیسرول، ریبوز و اریتریتول بودند ولی هیچ یک از جدایه‌ها نتوانستند از لاکتوز، تری‌هالوز، رامنوز، سلوبیوز و ادونیتول اسید تولید نمایند. همچنین جدایه‌ها قادر به استفاده از سلوبیوز، رافینوز، اینولین، تریپتوفان، ال‌تیروزین، دی‌تارتارات، ال‌تارتارات و ال‌آل‌آلین نبودند. همه جدایه‌ها قابلیت قلیایی کردن شیر را داشتند. براساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی تمامی جدایه‌های مورد بررسی به‌عنوان جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

بیماری‌زایی: روی ساقه‌های هلوی مایه‌زنی شده، زخم‌های نکروتیک فرورفته که تقریباً پیرامون ساقه را احاطه کرده بودند، همراه با ترشح صمغ مشاهده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده بر مبنای درجه بیماری‌زایی صفر تا ۳ نشان داد که همه جدایه‌ها دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی هستند. به جز جدایه‌های M8، Az22، A29 (جدا شده از آلو) و Az8 و Q2 (جدا شده از زردآلو) که دارای درجه بیماری‌زایی ۲/۷ بودند، بقیه جدایه‌ها دارای درجه بیماری‌زایی ۳ یا نزدیک به ۳ بودند. بنابراین جدایه‌های PSS به‌دست آمده از استان‌های یاد شده از لحاظ بیماری‌زایی شباهت بالایی به همدیگر داشتند و تفاوت چندانی بین آنها مشاهده نشد. در نهال‌های شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، علائمی ظاهر نشد. جدایه‌های باکتری دوباره از زخم‌ها و شانکرها جداسازی گردیدند (شکل ۱).



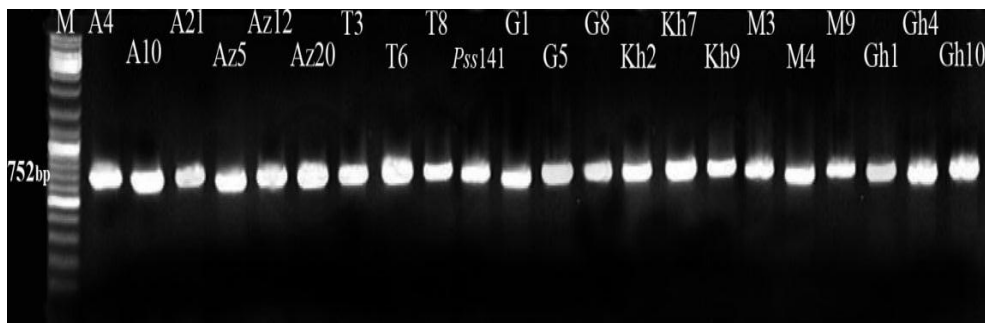
شکل ۱- نتایج آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های هلوی رقم *Loring* علایم شانکر روی شاخه همراه با ترشح صمغ.

الکتروفورز پروتیین: در مقایسه نقوش پروتیین‌های سلولی جدایه‌های PSS به‌دست آمده از مناطق مختلف، شباهت‌های بالایی را به یکدیگر و به جدایه استاندارد نشان دادند. نقوش پروتیینی جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار نیز مشابه بود. نقوش پروتیین‌های سلولی برخی از جدایه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است.



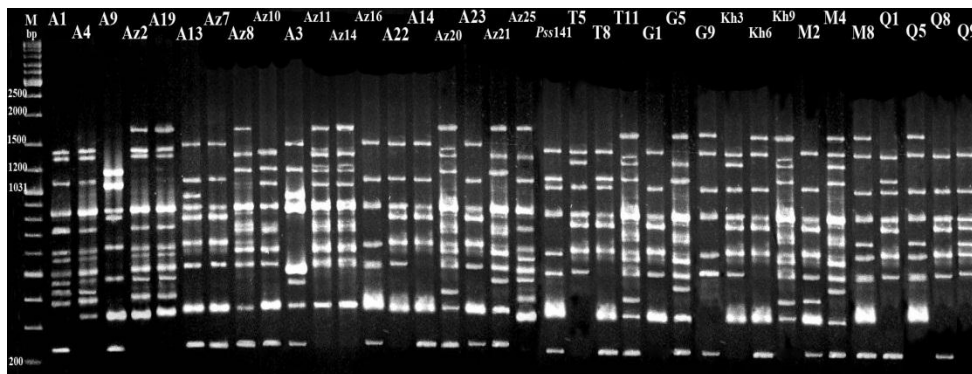
شکل ۲- نقوش الکتروفورزی پروتیین‌های محلول سلولی جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی از مناطق مختلف استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) در ژل پلی‌اکریلامید، Pss141: جدایه استاندارد.

ردیابی ژن سرینگومایسین (*syRB*): محصول PCR جدایه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. همه جدایه‌های PSS مورد مطالعه یک باند ژنی با وزن مولکولی ۷۵۲ جفت بازی را تکثیر نمودند که به‌طور کامل شبیه به جدایه استاندارد بود (شکل ۳).



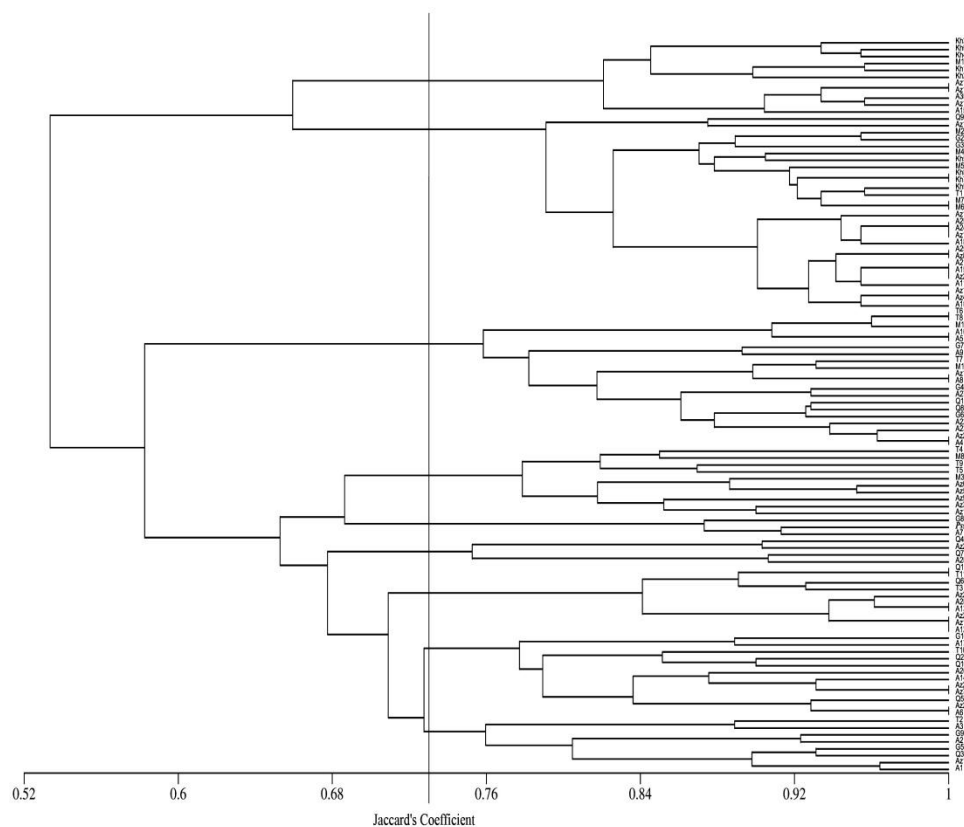
شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به علاوه جدایه‌ی استاندارد (Pss141) با استفاده از آغازگر *sybB* (B1 & B2) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (نام جدایه‌ها همراه با M؛ استاندارد جرم مولکولی (Fermentase از شرکت 100 bp DNA-Ladder) در بالای شکل درج شده است).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از BOX-PCR و IS50-PCR DNA ژنومی هریک از جدایه‌های Pss به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار با روش BOX-PCR تکثیر گردید. شکل ۴ اثر انگشت ژنتیکی برخی از جدایه‌های Pss را نشان می‌دهد. تعداد باندهای تکثیر شده با این روش بین ۷ تا ۱۵ باند با اندازه تقریبی ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بود. آنالیز خوشه‌ای نتایج به‌دست آمده با آغازگر BOXAIR نشان داد که در سطح تشابه ۵۵ درصد، جدایه‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. از بین جدایه‌های به‌دست آمده از استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گیلان، مازندران، خراسان رضوی، تهران و قزوین، ۳۹ جدایه در یک گروه و بقیه جدایه‌ها در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۵). در سطح تشابه ۷۳ درصد جدایه‌ها به ۹ گروه قابل تمایز بودند. جدایه استاندارد (Pss141) به همراه یک جدایه از اردبیل (A7) و یک جدایه از گیلان (G8) در یک گروه قرار گرفتند.



شکل ۴- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های *P. syringae pv. syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به‌علاوه جدایه استاندارد (Pss141) حاصل از BOX-PCR با آغازگر BOXA1R در ژل آغازی ۱/۵ درصد (نام جدایه‌ها همراه با M؛ استاندارد جرم مولکولی (100 bp DNA-Ladder از شرکت Fermentase) در بالای شکل درج شده است).

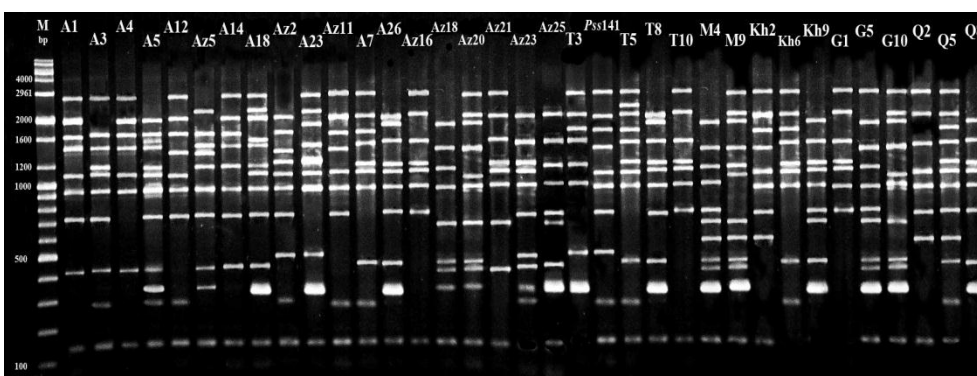
اثر انگشت ژنومی حاصل از تکثیر DNA برخی از جدایه‌های Pss به‌دست آمده از استان‌های مختلف با روش IS50-PCR در شکل ۶ نشان داده شده است. تعداد باندهای تکثیر شده بین ۸ تا ۱۴ باند و محدوده اندازه باندها بین ۱۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. آنالیز خوشه‌ای نتایج به‌دست آمده با آغازگر IS50 نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه با ۶۰ درصد تشابه در دو گروه قرار می‌گیرند که یک گروه شامل ۳۸ جدایه از مناطق مختلف استان‌های یاد شده بود و بقیه‌ی جدایه‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۷). در سطح تشابه ۷۳ درصد نیز، جدایه‌ها به ۸ گروه قابل تمایز بودند. جدایه استاندارد به‌علاوه، ۱۰ جدایه از اردبیل (A1, A5, A7, A8, A9, A12, A17, A18, A19, A20)، ۴ جدایه از آذربایجان شرقی (Az5, Az11, Az21, Az25)، ۳ جدایه از گیلان (G4, G8, G9)، ۲ جدایه از تهران (T3, T5)، ۵ جدایه از قزوین (Q5, Q6, Q7, Q9, Q10) و یک جدایه از مازندران (M3) در یک گروه قرار گرفتند.



شکل ۵- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان ۱۰۵ جدایه *P. syringae* pv. *syringae* به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار باکتریایی از استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به علاوه جدایه استاندارد (Pss141) براساس نقوش قطعات حاصل از BOX-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل درج شده است).

آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از دو روش BOX-PCR و IS50-PCR: نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از دو آغازگر BOXA1R و IS50 به صورت مرکب نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه، با ۶۰ درصد تشابه در دو گروه قرار می‌گیرند که گروه اول شامل ۵۵ جدایه به دست آمده از استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گیلان، مازندران، خراسان رضوی، تهران و گیلان بود و بقیه جدایه‌ها به همراه جدایه‌ی استاندارد در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۸). در سطح تشابه ۷۳ درصد

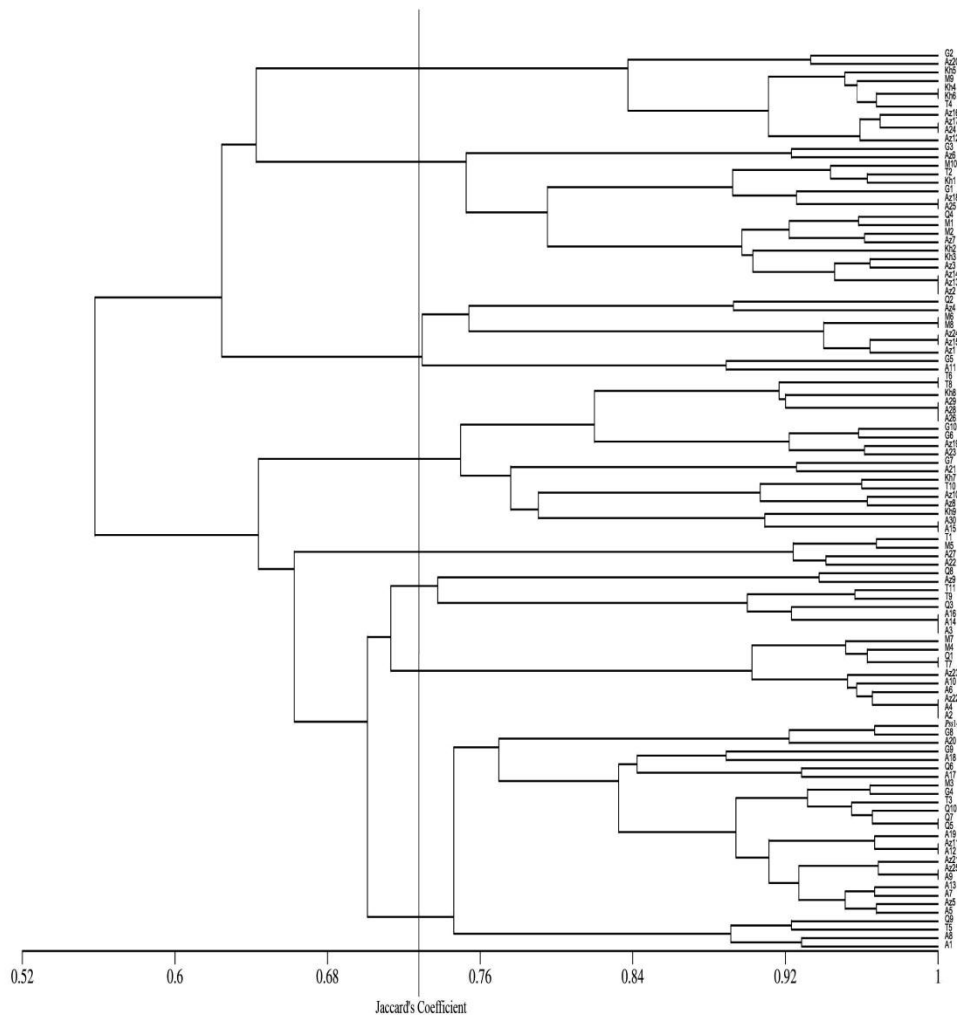
جدایه‌ها به ۱۱ گروه قابل تمایز بودند. جدایه‌ی استاندارد به همراه ۲ جدایه از مازندران (M7, M8)، ۴ جدایه از اردبیل (A7, A9, A12, A13)، ۳ جدایه از آذربایجان شرقی (Az5, Az21, Az25) و یک جدایه از هر یک از استان‌های گیلان (G7)، تهران (T9) و قزوین (Q5) در یک گروه قرار گرفتند.



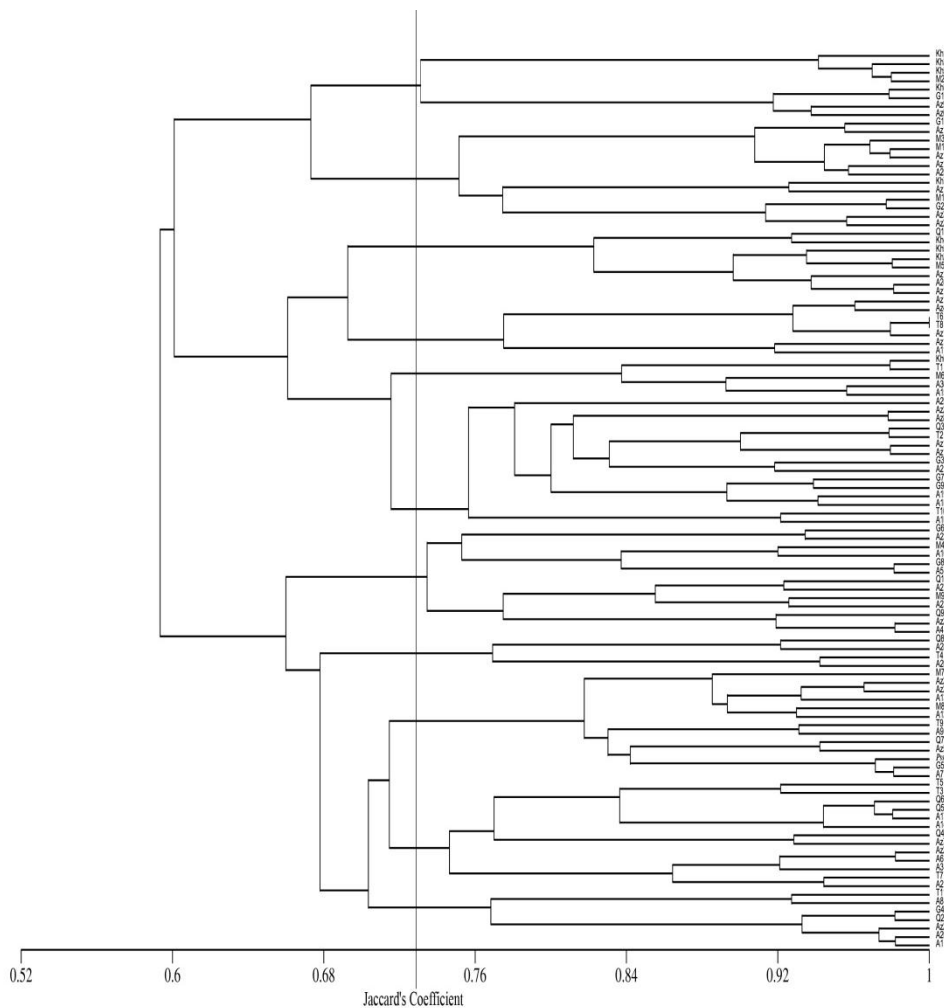
شکل ۶- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از IS50-PCR جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* به دست آمده از استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به علاوه جدایه استاندارد (Pss141) با آغازگر IS50 در ژل آگارز ۱/۵ درصد (نام جدایه‌ها همراه با M؛ استاندارد جرم مولکولی (100 bp DNA-Ladder از شرکت Fermentase) در بالای شکل درج شده است).

بحث

جدایه‌های مورد مطالعه به‌خاطر تولید لوان، عدم تولید اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز، نداشتن توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و ایجاد فوق حساسیت در برگ‌های شمعدانی و توتون (LOPAT) جزو گروه یک سودوموناس‌ها بوده و به‌عنوان گونه *Pseudomonas syringae* شناسایی شدند و سایر خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها با خصوصیات پاتووار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* مطابقت داشت (پالرونی، ۱۹۸۴). همچنین، در آزمون‌های سری GATTA ذوب ژلاتین و هیدرولیز اسکولین مثبت و مصرف تارتارات و فعالیت تیروزیناز منفی بود که براساس نتایج ویسنت و همکاران (ویسنت و همکاران، ۲۰۰۷) از ویژگی‌های پاتووار Pss محسوب می‌شود. بنابراین همه جدایه‌های به‌دست آمده در این پژوهش به‌عنوان Pss شناسایی شدند. رحیمیان و همکاران (۲۰۰۴) شانکر باکتریایی ناشی از Pss را یک بیماری مهم با گسترش وسیع روی درختان هلو و شلیل در مناطق مازندران و گرگان عنوان نمودند.



شکل ۷- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان ۱۰۵ جدایه *P. syringae* pv. *syringae* به دست آمده از درختان میوه هسته دار مبتلا به شانکر باکتریایی از استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به علاوه جدایه استاندارد (Pss141) بر اساس نقوش قطعات حاصل از IS50-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل درج شده است).



شکل ۸- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های *P. syringae pv. syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار مبتلا به شانکر باکتریایی از استان‌های اردبیل (A)، آذربایجان شرقی (Az)، گیلان (G)، مازندران (M)، خراسان رضوی (Kh)، تهران (T) و قزوین (Q) به‌علاوه جدایه استاندارد (Pss141) براساس نقوش قطعات حاصل از BOX-PCR و IS50-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل درج شده است).

نتایج به دست آمده نشان داد که واکنش تمامی جدایه‌های PSS در آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مشابه یکدیگر بودند. مطالعات قبلی نیز بیانگر تشابه زیاد بین جدایه‌های مختلف PSS از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی می‌باشد (الداغی و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، این خصوصیات نتوانست تنوع جدایه‌ها را به خوبی نشان دهد (هیرانو و آپر، ۲۰۰۰). جدایه‌ها از نظر الگوی پروتئین‌های سلولی در ژل پلی‌اکریل‌آمید با یکدیگر مشابه بوده و شباهت زیادی با جدایه‌ی استاندارد داشتند و تفاوت مختصری بین جدایه‌ها آن هم فقط در چند باند سبک وجود داشت. شباهت الگوی پروتئینی جدایه‌های مختلف PSS درختان میوه هسته‌دار در بررسی‌های قبلی نیز گزارش شده است (الداغی و همکاران، ۲۰۰۰ و ۲۰۰۹).

جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که همه جدایه‌های PSS مورد مطالعه روی گیاهچه‌های هلو توانایی ایجاد علائم شانکر را داشته و از قدرت بیماری‌زایی بالایی برخوردار بودند و از این لحاظ تنوع قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌ها مشاهده نشد. نتایج مشابه در مطالعه‌های قبلی نیز به دست آمده است (لیتل و همکاران، ۱۹۹۸؛ نجفی‌پور و تقوی، ۲۰۱۱). همه جدایه‌های به دست آمده در این مطالعه توانستند قطعه ۷۵۲ جفت بازی را با آغازگر *syfB* تکثیر کنند. این نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های PSS توانایی تولید توکسین سرینگومایسین را دارند که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (لیتل و همکاران، ۱۹۹۸؛ نجفی‌پور و تقوی، ۲۰۱۱). توکسین سرینگومایسین نقش مهمی در بیماری‌زایی PSS دارد (مو و گروس، ۱۹۹۱).

دی برئین و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که روش‌های مبتنی بر PCR دارای ثبات و کارایی بیشتری بوده و برای تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های میکروبی واقع در یک گروه بسیار مفید هستند. در این پژوهش پس از انجام PCR با روش‌های BOX-PCR و IS50-PCR اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها به دست آمد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل از روش‌های فوق با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد نشان داد که جدایه‌های PSS به دست آمده از مناطق مختلف استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، گیلان، مازندران، خراسان رضوی، تهران و قزوین دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند. با این حال محل جمع‌آوری جدایه‌ها هیچ تأثیری در خوشه‌بندی آنها نداشت و رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و منطقه جغرافیایی جدایه‌ها مشاهده نشد. وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های مختلف PSS درختان میوه هسته‌دار و سایر میزبان‌ها در بررسی‌های قبلی نیز گزارش شده است (موسیوند و همکاران، ۲۰۰۹؛ نجفی‌پور و تقوی، ۲۰۱۱). در این بررسی مشخص شد که

اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها با روش BOX-PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش مولکولی کارا و مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف Pss درختان میوه هسته‌دار و حتی سایر میزبان‌ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مشخص گردید که توالی‌های الحاقی (IS) که در ژنوم باکتری‌ها به‌طور گسترده پراکنده هستند، می‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف Pss به‌عنوان روشی مناسب استفاده گردد که با نتایج مطالعات پژوهشگران قبلی مطابقت دارد (کریمی علویجه و همکاران، ۲۰۰۸؛ گیلبرت و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این بررسی به نظر می‌رسد روش BOX-PCR نسبت به روش IS50-PCR بهتر می‌تواند تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف Pss هسته‌داران را نشان دهد.

یکی از دلایل تنوع بالا بین جدایه‌های Pss به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار احتمالاً به‌دلیل سابقه‌ی طولانی کشت این درختان در استان‌های یاد شده می‌باشد، به‌طوری‌که میکروفلور همراه، با گذشت زمان با میزبان‌های مختلف هسته‌داران سازگار شده‌اند. دندروگرام ترسیم شده بر اساس ترکیب داده‌های به‌دست آمده از BOX و IS50-PCR بهتر از دندروگرام‌های مربوط به هر یک از آنها به تنهایی، ارزیابی شد. به‌طوری‌که ضریب کوفتتیک BOX و IS50 به ترتیب ۰/۹۰، ۰/۹۱ و ترکیب این سه آغازگر برابر ۰/۹۲ بود. رادماکر و همکاران (۲۰۰۰) نیز پیشنهاد کردند که برای یک خوشه‌بندی با ثبات‌تر، بهتر است داده‌ها با هم ترکیب شوند. موسیوند و همکاران (۲۰۰۹) نیز برای به دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر از آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از آغازگرها استفاده کردند.

نتایج مطالعات انجام شده می‌تواند نشانگر این باشد که جدایه‌های مختلف Pss به‌صورت ژنتیکی با یک میزبان خاص سازگار شده‌اند (نجفی‌پور و تقوی، ۲۰۱۱) و تنوع در میان جدایه‌های مختلف این پاتووار به دلیل گسترده بودن دامنه میزبانی آن به مراتب بیشتر از سایر پاتووارهای گونه *Pseudomonas syringae* می‌باشد (روز و هاتینگ، ۱۹۸۷).

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای دکتر پژمان خدایگان (از دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان) به‌خاطر اهدای تعدادی از جدایه‌ها و زحماتی که در طول این پژوهش کشیده‌اند، صمیمانه تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, London, UK.
2. Aldaghi, M., Mmohammadi, M., Rahimian, H. and Sharifi-Tehrani, A. 2000. Serological and molecular comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from stone fruit trees, wheat and barley. Proceeding of the 14th Plant Protection Congress of Iran, p. 179.
3. Aldaghi, M., Rahimian, H. and Mohammadi, M. 2009. Comparison of phenotypic, serological and biochemical characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of bacterial canker of stone fruits and blight of cereals. Iran. J. Plant Pathol. 45: 317-336.
4. Arabi, F., Nickraves, Z., Babaizad, V., Rezaeian, V. and Rahimian, H. 2006. The occurrence of bacterial blight of beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. Iran. J. Plant Pathol. 42: 471-655.
5. Bahar, M., Mochtahedi, H. and Akhiani, A. 1985. Bacterial canker of apricot in Esfahan. Iran. J. Plant Pathol. 18: 58-68.
6. Berg, D.E. and Howe, M.M. (EDS.). 1989. *Mobile DNA*. Washington. D.C: American Society of Microbiology Publication.
7. Bradbury, J.F. 1986. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, p. 175-177. In: Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
8. de Bruijn, F.J., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbach, U. and Louws, F.J. 1996. Rep-PCR Genomic Fingerprinting of plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analysis. In: Grey, S., Beth, M. and Peter, M. G (eds), Biology of Plant-Microbe Interaction, Vol. 1, APS Press, Pp: 497-502.
9. Fariis, J.S. 1969. On the cophenetic correlation coefficient. Syst. Zool. 18: 279-285.
10. Gilbert, V., Legors, F., Maraite, H., and Bultreys, A. 2009. Genetic analysis of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae* and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. Euro. J. Plant Pathol. 124:199-218.
11. Hayward, A.C. 1996. Molecular biology in systematic and diagnosis of phytopathogenic prokaryotes. Phytopathol. 24: 271-274.
12. Hirano, S.S. and Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem eith emphasis on *Pseudomonas syringae*: a pathogen, ice nucleus and epiphyte. Microbiol. Mol. Bio. Rev, 64: 624-653.
13. Jones, A.A. 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. Plant Dis. 55:961-965.

14. Karimi-Alvije, Z. and Rahimian, H. 2008. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains using rep-PCR and IS50-PCR. Proceeding of the 18th Plant Protection Congress of Iran, 434p.
15. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227: 680-685.
17. Lilley, A.K., Bailey, M.J. and Fry, J.C. 1996. Diversity of mercury resistance plasmid obtained by exogenous isolation from the bacteria of sugar beet in three successive seasons. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 20: 211-227.
18. Little, E.L., Bostock, R.M. and Kirkpatrick, B.C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from stone fruits in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3818-3823.
19. Louws, F.G., Fulbright, D.W., Stephans, C.T. and de Bruijn, F.G. 1994. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2299.
20. Mahillon, J. and Chandler, M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 725-744.
21. Martin, F.N. and English, J.T. 1997. Population genetics of soil born fungal plant pathogens. *Phytopathol.* 87: 446-447.
22. Milgroom, M.G. and Fry, W.E. 1997. Contribution of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Rev. Plant Pathol.* 59: 153-168.
23. Mo, Y.Y., and Gross, DC, 1991. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 173: 5784-5792.
24. Mosivand, M., Rahimian, H. and Shams-Bakhsh, M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from sugarcane, stone fruits and wheat. *Iran. J. Plant Pathol.* 45: 75-85.
25. Najafipour, G. and Taghavi, S.M. 2011. Comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. *J. Agric. Sci. Technol.* 13: 431-442.
26. Norelly, J.L., Aldwinckle, H.S. and Beer, S.V. 1984. Differential host pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.* 47: 136-139.
27. Palleroni, N.J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* (Migula 1984), p. 141-199. In: J. G. Holt and N.R. Kreig (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
28. Rademaker, J.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterine, L., Vauterine, P. and de Bruijn, F.J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR

- genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evo. Microbiol. 50: 665-677.
29. Rahimian, H. 1994. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced in Iran. Phytopathol. 143: 321-324.
 30. Rahimian, H. 1989. The occurrence of bacterial blight of wheat introduced in Kerman. Proceeding of the 11th Plant Protection Congress of Iran, Guilan: 146p.
 31. Rahimian, H., Nickraves, Z., Arabi, F. and Rezaeian, V. 2004. The interference of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in blossom blast of peach in Mazandaran. Proceeding of the 16th Plant Protection Congress of Iran, Tabriz. 424p.
 32. Rohlf, F.J. 1990. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software, New York.
 33. Roos, I.M. and Hattingh, M.J. 1987. Systemic invasion of plum leaves and shoot by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced into petioles, Phytopathol. 77: 1253-1257.
 34. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third eds. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 373p.
 35. Sneath, P.H. and Sokal, R.R. 1973. The principles and practice of numerical classification. Numerical Taxonomy, San Francisco: W.H. Freeman & Co. 278p.
 36. Sokal, R. and Rohlf, F.J. 1962. The comparisons of dendrograms by objective methods. Taxon, 11: 33-40.
 37. Sorensen, K.N., Kim, K.H. and Takemoto, J.Y. 1998. PCR Detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Appl. Environ Microbiol. 64: 226-230.
 38. Sulikowska, M. and Sobiczewski, P. 2008. *Pseudomonas* spp. Isolated from stone fruit trees in Poland. Zemdirbyste-Agriculture, 95: 166-170.
 39. Ullrich, M., Bereswill, S., Volksch, W. and Geider, K. 1993. Molecular characterization of field isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* differing in coronatine production. J. General Microbiol. 139: 1927-1937.
 40. Versalovic, J., Scheider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. Meth. Mol. Cell. Biol. 5: 25-40.
 41. Vicente, J.H., Alves, J.P., Russell, K. and Roberts, S.J. 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. Euro. J. Plant Pathol. 110: 337-351.
 42. Weingart, H. and Volksch, B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP- and IS50-PCR. Phytopathol. 145: 339-345.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 20 (3), 2013

<http://jopp.gau.ac.ir>

Identification and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains causing bacterial canker in stone fruits in several northern and central provinces of Iran

*V. Abasi¹, H. Rahimian² and M.A. Tajick-Ghanbari³

¹M.Sc. Graduated of Plant Pathology Science, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources, ²Professor Dept. of Plant Pathology, Sari University of Agricultural Science and Natural Resources, ³Assistant Prof., Dept. of Plant Pathology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 07/25/2012; Accepted: 06/02/2013

Abstract

Bacterial canker of stone fruits caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) is widespread throughout Ardebil and Azarbaijane sharghi provinces. In this research samples were collected from various areas in Ardebil, Eastern Azarbaijane, Guilan, Mazandaran, Khorasane Razavi, Tehran and Qazvin provinces during 2010-2011. A total of 105 bacterial isolates were compared based on their phenotypic (physiological & biochemical) characteristics, pathogenicity and total cellular protein profiles (SDS-PAGE). Pss strains showed slight differences in phenotypic characteristics and protein profiles. All 105 strains of Pss tested were highly pathogenic on peach seedlings. All strains appeared to be similar in pathogenicity. All Pss isolates and Pss141 amplified a 752-bp fragment with the *syrB* primers. Genetic diversity among the strains was assessed by BOX- and IS50-PCR. Strains formed 9 and 8 clusters in the BOX-PCR and IS50-PCR, at 73% similarity level, respectively and by the combination data set of both BOX and IS50-PCR, strains formed 11 clusters. There was no significant correlation between genetic diversity and geographical origin of the isolates. The results demonstrated the existence of a considerable genetic diversity among Pss strains causing canker of stone fruit trees in various provinces of Iran. In this study, no correlation was observed between the Pss strains origin and their clusters.

Keywords: Bacterial canker, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Genetic diversity, BOX-PCR, IS50-PCR.

* Corresponding Author; Email: valeh.abasi@gmail.com