

## شناسایی عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در استان کهگیلویه و بویراحمد و مقایسه‌ی مقاومت برخی ارقام گیلاس نسبت به آن

معصومه عرفانی‌نیک<sup>۱</sup>، رسول رضائی<sup>۲\*</sup> و حبیب‌الله چاره‌گانی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.  
۲- استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

نویسنده مسئول: [rrezaei@yu.ac.ir](mailto:rrezaei@yu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۰

### چکیده

باکتری عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*)، بیمارگر خطرناکی است که به بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی مختلف حمله می‌کند. به دلیل اهمیت بیماری، هدف از انجام این تحقیق شناسایی دقیق عامل بیماری در استان کهگیلویه و بویراحمد و مقایسه‌ی مقاومت برخی ارقام گیلاس نسبت به عامل بیماری بود. طی سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵، از درختان هسته‌دار دارای علائم شانکر، ترشح صمغ و لکه‌برگی، ۳۳ سویه‌ی باکتری جداسازی شد. سویه‌های مورد بررسی، میله‌ای شکل، متحرک، گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز منفی، کاتالاز مثبت، لوان مثبت، و واکنش فوق حساسیت مثبت و فاقد توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. ژن‌های مسئول تولید *(syfB)* و ترشح *(syfD)* زهرابه سیرینگومایسین در تمام سویه‌های مورد مطالعه در آزمون PCR ردیابی شدند. تمام جدایه‌های *Pss* مایه‌زنی شده به میوه‌ی گیلاس توانایی ایجاد لکه‌های نکروز را داشتند ولی پرآزاری متفاوتی نشان دادند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی و نتایج PCR همه جدایه‌ها به عنوان *Pss* شناسایی شدند. برای بررسی مقاومت ارقام گیلاس، ارقام تکدانه‌ی مشهد، قاهری و صورتی انتخاب شدند. از نظر شاخص‌های تعداد لکه نکروز روی برگ، طول ناحیه نکروز شاخه و جمعیت باکتری در بافت برگ، بین ارقام مختلف، اختلاف معنی‌دار وجود داشت. براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، رقم تکدانه‌ی مشهد بیشترین حساسیت و رقم صورتی کمترین حساسیت را به بیمارگر *Pss* نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، بیماری‌زایی، زهرابه، شانکر، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

### مقدمه

می‌باشد (بی‌نام ۱۳۹۲). از بیماری‌های مهم این گیاهان، شانکر باکتریایی بوده که به وسیله‌ی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) همکاران (۲۰۰۷). در ایران بیماری شانکر درختان هسته‌دار در استان‌های مرکزی، گلستان، مازندران، تهران، فارس، آذربایجان غربی و کردستان از اهمیت زیادی برخوردار است و همه ساله خسارت‌های زیادی به درختان میوه‌ی هسته‌دار وارد می‌سازد (قاسمی و همکاران ۱۳۸۳). باکتری *Pss* بیمارگری مخرب است که به بیش از ۲۰۰ گونه‌ی گیاهی مختلف حمله می‌کند. مهم‌ترین میزبان‌های این بیمارگر درختان میوه هسته‌دار،

ایران به علت موقعیت جغرافیایی خاص و داشتن اقلیم‌های مختلف از عمده‌ترین کشورهای تولیدکننده‌ی میوه‌های هسته‌دار در جهان می‌باشد. با توجه به افزایش جمعیت کشور و صادرات این محصولات، انجام برنامه‌ریزی اصولی جهت توسعه‌ی باغ‌ها و افزایش محصولات ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های افزایش محصولات باغی مبارزه با آفات و بیماری‌های این گیاهان می‌باشد. سطح زیرکشت درختان هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد، ۱۹۸۲ هکتار می‌باشد که گیلاس بعد از هلو بیش‌ترین سطح زیرکشت را دارا

و سرولوژیکی نمی‌توان سویه‌های بیماری‌زای *PSS* را از سویه‌های غیر بیماری‌زا جدا کرد، بنابراین باید حتماً آزمون‌های بیماری‌زایی انجام گردد (ویسنده و همکاران ۲۰۰۴). کنترل موفق شانکر باکتریایی به دلیل فقدان سموم یا مهار زیستی مناسب و خصوصیت درون‌رستی عامل بیماری چندان موفقیت‌آمیز نبوده است (گاسیک و همکاران ۲۰۱۲). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند استرپتومایسین مقرون به صرفه نبوده و موجب بروز مقاومت در جمعیت‌های باکتری می‌شود. ترکیبات مسی نیز برای کنترل این بیماری استفاده می‌شود و به دلیل پایداری بالا، وارد چرخه‌های اکولوژیک می‌شوند که مشکلات زیست محیطی بسیاری را به همراه دارد. با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری، مشکلات به‌کارگیری روش‌های کنترل شیمیایی و در واقع فقدان راهکار کنترل مؤثر، کاربرد ارقام مقاوم می‌تواند راه‌کاری کم‌هزینه، پایدار و غیرشیمیایی در مدیریت بیماری باشد. امروزه یکی از چالش‌های هسته‌داران تولید و پرورش ارقام مقاوم باکتریایی هسته‌داران تولید و پرورش ارقام مقاوم می‌باشد. به دلیل اهمیت بیماری و سطح زیر کشت بالای درختان هسته‌دار به خصوص گیلاس در استان کهگیلویه و بویراحمد، هدف از انجام این تحقیق شناسایی دقیق عامل بیماری و مقایسه مقاومت برخی ارقام گیلاس که در جنوب غرب کشور سطح زیر کشت بالایی دارند، نسبت به عامل بیماری می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری از شاخه و برگ آلوده

در بازدیدهایی که از باغ‌های مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد به عمل آمد، نمونه‌هایی از شاخه و برگ درختان میوه‌ی هسته‌دار دارای علائم بیماری، جمع‌آوری و به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی منتقل شدند. شاخه آلوده به شانکر در ابتدا چندین بار با آب شسته شده و سپس توسط محلول نیم درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و در پایان با آب مقطر سترون شست‌وشو شد. از حد فاصل بافت آلوده و سالم در

درختان میوه دانه‌دار و گیاهان علفی به ویژه گندم می‌باشند. این بیمارگر دارای دامنه‌ی میزبانی وسیع و سویه‌هایی است که از نظر خصوصیات بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و ژنتیکی تفاوت دارند. در ایران تا کنون باکتری *PSS* از گیاهان مختلفی مانند گندم، نیشکر، زردآلو، هلو، مرکبات و گلابی جداسازی و گزارش شده است (نجفی‌پور و تقوی ۲۰۱۱). این بیماری باعث کاهش کمی و کیفی محصول و کاهش عمر درخت به خصوص در گیلاس می‌شود، هم‌چنین می‌تواند در باغ‌های مسن ۱۰-۲۵ درصد، در باغ‌های جوان ۱۰-۷۵ درصد، و گاهی تا ۸۵ درصد خسارت وارد کند (ویسنده و همکاران ۲۰۰۴). خسارت این بیماری در درختان گیلاس، آلبالو، هلو و زردآلو دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد (بولتریز و کالونزا ۲۰۱۰). سویه‌های باکتری *PSS* علائم مختلفی در میزبان‌های خود ایجاد می‌کنند. علائم ایجاد شده به عوامل مختلفی مانند نوع میزبان، اندام گیاهی مورد حمله و سویه بیمارگر بستگی دارد. اگر باکتری به برگ‌های جوان حمله کند، روی برگ‌ها لکه‌های بافت مرده ایجاد می‌شود و برگ پس از ریزش این نواحی، ظاهری غربالی به خود می‌گیرد (کنلی و همکاران ۲۰۰۷). از دیگر علائم ایجاد شده توسط این باکتری می‌توان به شانکر ساقه، مرگ جوانه و سوختگی برگ اشاره کرد. باکتری *PSS* میله‌ای شکل با تاژک قطبی، گرم منفی و هوازی اجباری بوده و در حضور آرژنین می‌تواند به صورت بی‌هوازی رشد کند. اکثر سویه‌ها روی محیط فقر آهن، تولید رنگدانه‌ای می‌کنند که در نور ماوراءبنفش (طول موج ۲۵۴ نانومتر) به صورت فلورسنت در می‌آید (وارن و وولبر ۱۹۹۱). در اغلب موارد پرگنه‌های این باکتری روی محیط کشت (Nutrient Agar (NA) کرم رنگ است. بسیاری از جدایه‌های این باکتری در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس زیر صفر تا ۵ درجه‌ی سلسیوس بالای صفر، تولید هسته‌ی یخ می‌کنند. سویه‌های مختلف *PSS* که از میزبان‌های متفاوت جدا شده‌اند از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، آنزیمی، بیماری‌زایی و ژنتیکی تفاوت دارند (اسکورتیچینی و همکاران ۲۰۰۳). از آنجا که بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی

فلورسنت روی محیط KB، هیدرولیز ژلاتین، آرژینین دهیدرولاز، هیدرولیز آسکولین، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید لوآن (شاد و همکاران ۲۰۰۱)، واکنش فوق حساسیت روی برگ‌های توتون (کلمنت و همکاران ۱۹۶۴) و رشد هوازوی و بی‌هوازی (هیو و لایفزون ۱۹۵۳) انجام گرفت.

### ردیابی بیمارگر با آغازگرهای اختصاصی

به منظور ردیابی باکتری بیمارگر از دو آغازگر اختصاصی B1/B2 (سورنسن و همکاران ۱۹۹۸) و D1/D2 (بولتریز و گیسن ۱۹۹۹) با ترادف‌های

B1:5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'

B2:5'-TCGATTTTGCCTGATGAGTC-3'

D1:5'-CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC-3'

D2:5'-TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC-3'

استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD انجام شد. مواد مورد نیاز (محصول شرکت سیناژن ایران) در جدول ۱ آمده است. به منظور بررسی قطعات تکثیر یافته در PCR تشخیصی، الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز یک درصد با اختلاف پتانسیل ۹۰-۱۰۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه انجام گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه Gel documentation مشاهده و عکس‌برداری شد.

ناحیه پوست قطعات کوچکی جدا و در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار داده و به مدت یک ساعت روی دستگاه تکان دهنده گذاشته شد و سپس چند قطره از این محلول روی محیط کشت B Kings' (KB) و Nutrient Agar (NA) مخطط گردید. پرگنه‌های کرم رنگ فلورسنت که از روز دوم روی محیط کشت KB ظاهر شدند، جداسازی و خالص شدند. به منظور جداسازی باکتری از برگ آلوده، پس از شستشوی کامل برگ آلوده در هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر سترون به قطعات کوچک تقسیم شده و به مدت نیم ساعت در مقداری آب مقطر سترون نگهداری و سپس آب حاوی قطعات آلوده روی محیط کشت NA مخطط شد.

### شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی

به منظور تشخیص جدایه‌های بدست آمده از میزبان‌های آلوده، آزمون‌های مختلفی بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی انجام گرفت. این آزمون‌ها شامل اکسیداز (کواکز ۱۹۵۶)، کاتالاز (لیلیوت و همکاران ۱۹۸۴)، گرم، بررسی رنگ پرگنه روی محیط کشت‌های NA، Yeast Extract Dextrose (YED) و Calcium Carbonate Agar (YDC) و تولید رنگ

جدول ۱- مواد استفاده شده در واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
DNA template (25-50 ng/μl)	۲-۱
PCR Buffer 10×	۲/۵
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	۰/۷۵
Forward Primer (0.5 μM)	۱
Reverse Primers (0.5 μM)	۱
dNTPs (10mM)	۰/۵
Taq DNA Polymerase (5 U/μL)	۰/۲۵
ddH <sub>2</sub> O	۱۸-۱۷

مایه‌زنی اندازه‌گیری گردید. روی هر رقم برگ‌های شاهد با آب مقطر سترون و باکتری *Pseudomonas fluorescens* مایه‌زنی شدند (اندرت و ریچی ۱۹۸۴). شاخه‌ها به روش تزریق میزان دومیلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت تازه باکتری با  $OD_{600} = 0.5$  مایه‌زنی و روی محل‌های مایه‌زنی شده به مدت یک هفته با پارافیلیم پوشانده شد. در نهایت ۳۰ روز پس از مایه‌زنی، طول ناحیه‌ی نکروز زیر پوست اندازه‌گیری شد. نهال‌های شاهد در کنار سایر تیمارها با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند (ایتل و همکاران ۱۹۹۸).

#### بررسی دینامیک جمعیت باکتری در بافت گیاه

به منظور بررسی جمعیت باکتری در بافت برگ، روی برگ‌های ارقام مختلف گیلاس سه میلی‌لیتر سوسپانسیون کشت تازه باکتری با  $OD_{600} = 0.5$  اسپری گردید. دینامیک جمعیت چهار سویه در هر سه رقم گیلاس در ۱۲ ساعت (نیم‌روز)، یک، دو، سه، پنج، هفت و چهارده روز پس از مایه‌زنی به روش زیر اندازه‌گیری شد. در هر روز یک گرم از بافت برگ مایه‌زنی شده‌ی هر رقم گیلاس پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم و شستشو با آب مقطر سترون در هاون چینی سترون به همراه یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات عصاره‌گیری شدند. از عصاره برگ سری رقت تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت NSA حاوی ۶۰ پی پی ام آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین گذاشته و با میله L شکل کشت شد و در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۷۲ ساعت تعداد پرگنه‌های رشد کرده شمارش گردید (گراس و دی‌وای ۱۹۷۷).

#### محاسبات آماری

داده‌های حاصل در هر آزمایش به کمک نرم‌افزار آماری SAS مورد بررسی قرار گرفت. اثر تیمارها با تجزیه واریانس (ANOVA) انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح ۱٪ انجام

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه‌ی گیلاس به منظور بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف باکتری، از میوه‌ی گیلاس رقم تکدانه‌ی مشهد استفاده شد. ابتدا میوه‌ها به مدت سه دقیقه درون الکل ۵۰ درصد قرار گرفتند. سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو شده و سپس روی کاغذ صافی سترون قرار گرفتند. پس از خشک شدن، از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی با جذب نوری ۰/۵ در ۶۰۰ نانومتر تهیه و ۱۰ میکرولیتر از آن به هر میوه تزریق شد. پس از مایه‌زنی، میوه‌ها بر روی کاغذهای صافی سترون درون تشتک‌های پتری قرار گرفتند و به مدت چهار روز در ژرمیناتور با دمای ۲۴ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت ۹۰ درصد نگهداری و سپس قطر ناحیه نکروز اندازه‌گیری شد (کالونزا و سابیزسکی ۲۰۰۹).

#### بررسی مقاومت ارقام مختلف گیلاس

##### تهیه و نگهداری نهال‌ها

ارقام تکدانه‌ی مشهد، قاهری و صورتی به عنوان مهم‌ترین ارقام گیلاس در استان‌های جنوب غرب کشور که بیش‌ترین سطح زیر کشت را در استان کهگیلویه و بویراحمد دارا می‌باشند، انتخاب شدند. نهال‌های دو ساله و گواهی شده در مخلوطی مساوی از خاک، کود دامی و ماسه ضدعفونی شده در گلدان‌های ۱۰ کیلوگرمی کشت و هر دو روز یک بار آبیاری شدند. گلدان‌ها در گلخانه با دمای  $30 \pm 4$  درجه‌ی سلسیوس به مدت چهار ماه نگهداری شدند.

##### مایه‌زنی برگ و شاخه در شرایط گلخانه

برای هر سویه، هشت برگ هم‌اندازه از هر رقم گیلاس به آرامی با پودر کاربوراندوم خراش داده شدند، سپس به وسیله سرنگ سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت باکتری با  $OD_{600} = 0.5$  از سویه‌های گندم ( $W_1$ )، زردآلو ( $A_1$ )، گیلاس ( $C_1$ ) و سویه استاندارد IVIA773-1 روی برگ‌ها اسپری شد. از روز مایه‌زنی تا زمان ثبت علائم بیماری، برگ نهال‌ها با اسپری آب مرطوب نگه داشته شدند و نشانه‌های بیماری به صورت تعداد لکه‌های نکروز ۱۰ روز پس از

باکتریایی جداسازی گردید که تعداد ۳۳ جدایه‌ی گرم منفی با پرگنه‌ی کرم رنگ، گرد و محدب روی محیط کشت NA و پرگنه‌های فلورسنت روی محیط کشت KB برای انجام PCR و تست‌های بیماری‌زایی انتخاب شدند، یک سویه نیز از گندم که دارای نشانه‌های سوختگی برگ بود، جداسازی شد. (جدول ۲).

گرفت. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد.

### نتایج و بحث

**جداسازی و خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها**  
از درختان گیلاس، هلو، زردآلو و آلو در مناطق مختلف استان که نشانه‌های بیماری شانکر باکتری هسته‌داران را نشان می‌دادند، سویه‌های مختلف

جدول ۲- مشخصات سویه‌های PSS جداسازی شده از درختان میوه‌ی هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد.

کد سویه	میزبان	محل نمونه‌برداری	کد سویه	میزبان	محل نمونه‌برداری
C <sub>1</sub>	گیلاس	مارگون	A <sub>1</sub>	زردآلو	مارگون
C <sub>2</sub>	گیلاس	مارگون	A <sub>2</sub>	زردآلو	ياسوج
CM <sub>3</sub>	گیلاس	مارگون	A <sub>3</sub>	زردآلو	ياسوج
CM <sub>4</sub>	گیلاس	مارگون	A <sub>4</sub>	زردآلو	ياسوج
CM <sub>6</sub>	گیلاس	مارگون	P <sub>2</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>10</sub>	گیلاس	مارگون	PY <sub>1</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>12</sub>	گیلاس	مارگون	PY <sub>2</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>13</sub>	گیلاس	مارگون	PY <sub>3</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>15</sub>	گیلاس	مارگون	PY <sub>4</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>16</sub>	گیلاس	مارگون	PeN <sub>1</sub>	هلو	ياسوج
CM <sub>25</sub>	گیلاس	مارگون	(IVIA773-1)	گلابی	-
CM <sub>29</sub>	گیلاس	ياسوج	Pl	آلو	ياسوج
C <sub>3</sub>	گیلاس	ياسوج	Al	بادام	ياسوج
CGo <sub>1</sub>	گیلاس	ياسوج	Chr	گیلاس	ياسوج
CGo <sub>2</sub>	گیلاس	ياسوج	Chb	گیلاس	ياسوج
CGa <sub>1</sub>	گیلاس	ياسوج	Ps7r	هلو	ياسوج
W <sub>1</sub>	گندم	ياسوج	Ps17r	هلو	ياسوج

نمودند. در آزمون‌های گروه LOPAT نتیجه واکنش‌های اکسیداز، لهیدگی سیب‌زمینی و آرژنین دهیدرولاز در کلیه سویه‌ها منفی، اما نتیجه آزمون‌های لوآن و فوق

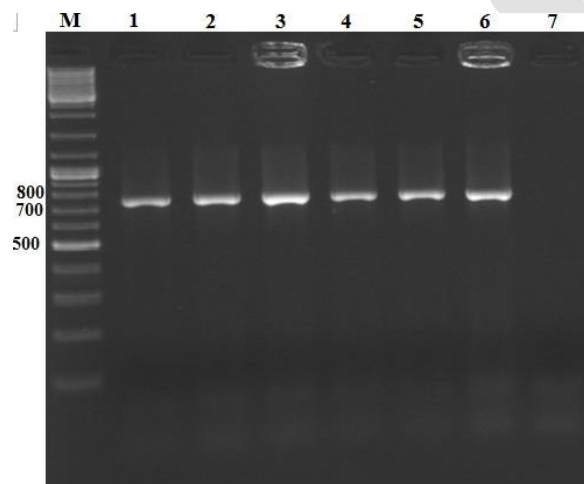
کلیه‌ی سویه‌ها روی محیط کشت KB تولید رنگدانه سبز فلورسنت و روی محیط آگار مغذی، پرگنه‌های گرد به رنگ کرم روشن یا مایل به زرد با حاشیه صاف تولید

جفت آغازگر اختصاصی D1 و D2 قطعه ۱۰۴۰ جفت بازی در این جدایه‌ها تکثیر شد (شکل ۲). تولید سیرینگومایسین منحصر به سویه‌های *Pss* بوده و توسط سودوموناس‌های دیگر گزارش نشده است (گراس و دی‌وای ۱۹۷۷). بیماری شانکر باکتریایی هسته داران توسط پاتووارهای مختلف *P. syringae* از جمله *P. syringae* pv. *P. syringae* pv. *syringae* و *morsprunorum* ایجاد می‌شود که بر اساس خصوصیات فنوتیپی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی، همه جدایه‌ها به عنوان *P. syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند.

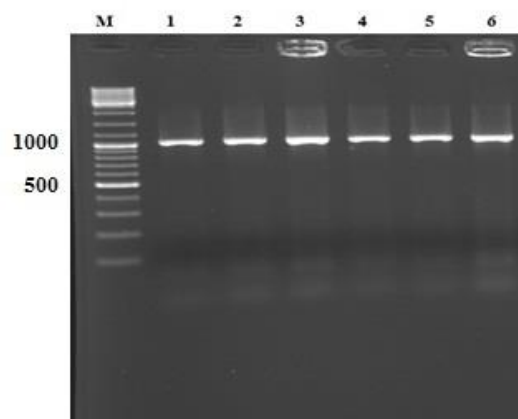
حساسیت در توتون مثبت بود. سویه‌ها در آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز آسکولین واکنش مثبت نشان دادند.

#### ردیابی باکتری عامل شانکر هسته‌داران با آغازگرهای اختصاصی

ژن مسئول تولید زهرابه‌ی سیرینگومایسین (*syfB*) در تمام سویه‌های *Pss* مورد مطالعه ردیابی شد. در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B1 و B2 قطعه‌ی قابل انتظار ۷۵۲ جفت بازی از تمام جدایه‌های *Pss* تکثیر شد، اما از نمونه‌های دی ان ای *P. fluorescens* چنین قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۱). ژن مسئول ترشح زهرابه‌ی سیرینگومایسین (*syfD*) نیز در تمام جدایه‌های مورد مطالعه ردیابی و با استفاده از



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR جدایه‌های مختلف *Pss* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B1 و B2 و تکثیر قطعه ۷۵۲ جفت بازی M: مارکر مولکولی، 1: W1، 2: C1، 3: A1، 4: P2، 5: C3، 6: 7، *P. fluorescens*

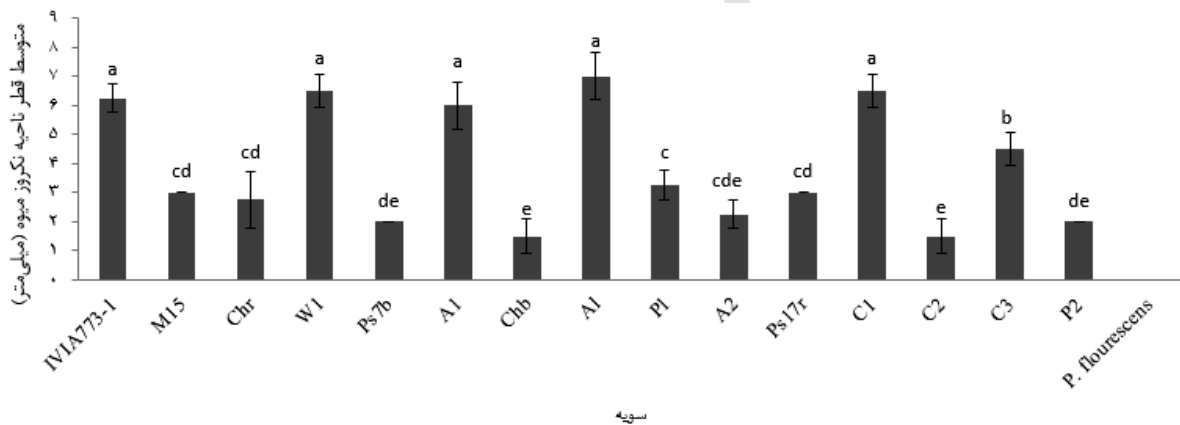


شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR جدایه‌های مختلف *Pss* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی D1 و D2 و تکثیر قطعه ۱۰۴۰ جفت بازی M: مارکر مولکولی، 1: W1، 2: C1، 3: A1، 4: P2، 5: C3، 6: 7، *P. syringae*

بیماری‌زایی قابل توجهی داشته که حتی از بیماری‌زایی برخی سویه‌های جدا شده از هسته‌داران بیش‌تر بود. پس از مایه‌زنی باکتری ساپروفیت *P. fluorescens* به میوه‌ی گیلاس، هیچ‌گونه نشانه‌ی نکروز ایجاد نگردید. تفاوت بیماری‌زایی جدایه‌ها، به دلیل تولید ترکیبات مختلف بیماری‌زا می‌باشد. ترکیبات سمی از قبیل زهرابه‌های سیرینگوامیسین و سیرینگوپپتین توسط اکثر سویه‌های *PSS* تولید می‌شوند و این ترکیبات در بیماری‌زایی *PSS* نقش اصلی را دارند. البته فاکتورهای دیگری نیز مانند سیدروفورها، عملگرهای سیستم ترشحی نوع III و آنزیم‌های تولید کننده‌ی اکسین در بیماری‌زایی سویه‌های *PSS* نقش دارند (ویسنده و همکاران ۲۰۰۴).

### آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *PSS* روی میوه گیلاس

جدایه‌های مختلف که با استفاده از خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی به عنوان *PSS* شناسایی شده بودند، برای بررسی بیماری‌زایی به میوه گیلاس رقم تکدانه مشهد مایه‌زنی شدند. برای آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *PSS*، مایه زنی میوه‌ی گیلاس به عنوان یک روش استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است (کالونزا و سابی‌زسکی ۲۰۰۹). کلیه‌ی سویه‌های *PSS* مایه‌زنی شده به میوه، لکه‌های نکروز را در اندازه‌های متفاوت ایجاد کردند. در واقع تمام این جدایه‌ها بیماری‌زا بودند اما پرازایی متفاوتی داشتند (شکل ۳). جدایه‌های C1، W1، A1 و IVIA773-1 بیش‌ترین و وسیع‌ترین نکروز را در میوه ایجاد کردند. سویه W1 که از گندم جدا شده،

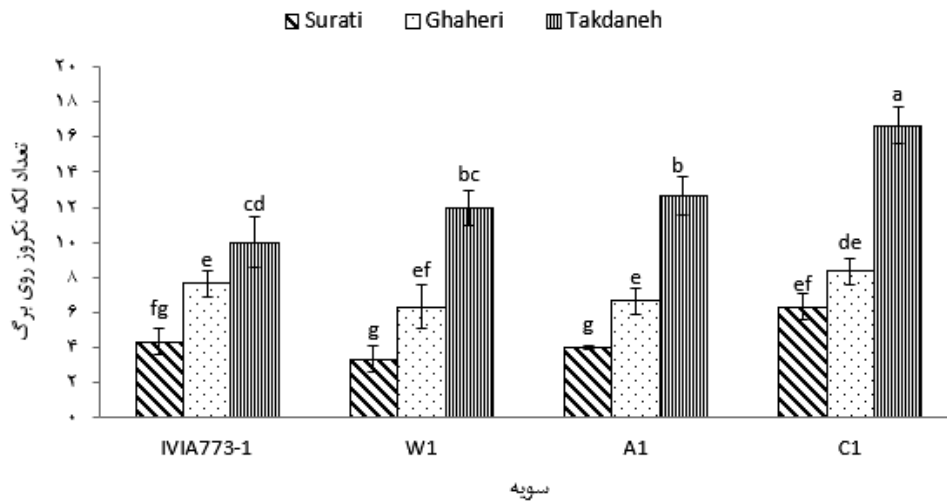


شکل ۳- بیماری‌زایی (متوسط قطر ناحیه نکروز) جدایه‌های مختلف *PSS* روی میوه‌ی گیلاس رقم تکدانه مشهد (حروف متفاوت نشانگر معنی‌دار بودن تفاوت میزان نکروز میوه می‌باشد).

میانگین تعداد لکه‌های نکروز روی برگ ارقام مختلف گیلاس در برابر سویه‌های مختلف *PSS* در شکل ۴ نشان داده شده است.

### بررسی مقاومت ارقام مختلف گیلاس

برای ارزیابی مقاومت ارقام تکدانه مشهد، قاهری و صورتی از شاخص‌های تعداد لکه نکروز روی برگ و طول ناحیه‌ی نکروز شاخه استفاده گردید. مقایسه



شکل ۴- میانگین تعداد لکه نکروز ایجاد شده توسط جدایه‌های PSS روی برگ ارقام مختلف گیلاس (حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد).

می‌کنند. برخی معتقدند که تنوع بالای سویه‌های PSS به دلیل تفاوت در شدت بیماری‌زایی است و ارتباطی با توانایی و تخصص این سویه‌ها در آلوده کردن میزبان‌های خاص ندارد (اندرد و ریچی ۱۹۸۴). برگ درخت گیلاس حاوی نوعی گلوکوزید فنلی است که بر بیوسنتز سیرینگومایسین تأثیر می‌گذارد لذا تفاوت در محتوای فنلی برگ ارقام مختلف توجیه‌کننده‌ی یکسان نبودن مقاومت آن‌هاست. آربوتین یک بتاگلوکوزید فنلی است که در بیش از ده خانواده دو لپه وجود دارد. در گلابی آربوتین ۳ تا ۵ درصد مواد برگی را تشکیل می‌دهد (مو و همکاران ۱۹۹۵). در برگ‌های گیلاس دو گلوکوزید فلاونولی به نام‌های کوئرسیتین و کمپفرول و دی هیدرووگونین به عنوان سیگنال‌های القاکننده زهرابه سیرینگومایسین شناخته شده‌اند (مو و گراس ۱۹۹۱). فعالیت سیگنالی ترکیبات فنولی به طور قابل ملاحظه‌ای در حضور مواد قندی افزایش می‌یابد (مو و گراس ۱۹۹۱). این قندها در بافت برگ به مقدار زیاد یافت می‌شود. سوکروز و فروکتوز فعال‌ترین این قندها به شمار می‌آیند. سه درصد وزن خشک بافت‌های برگ گیلاس از این دو قند تشکیل شده است (کلر و لوشر ۱۹۸۹). به نظر می‌رسد که همه سویه‌های PSS دارای سازوکاری برای دریافت متابولیت‌های اختصاصی گیاهی هستند (کویگی و گراس ۱۹۹۴).

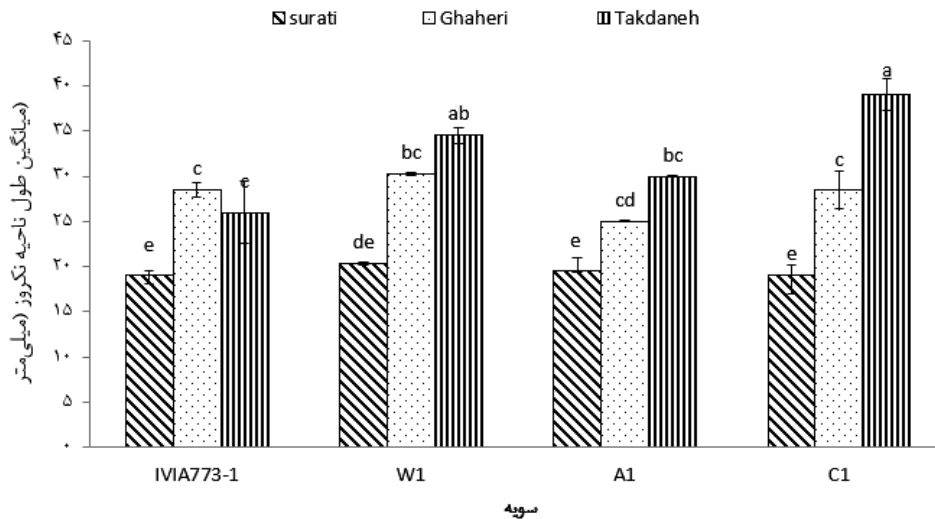
همانگونه که مشاهده می‌شود از نظر تعداد لکه‌ی نکروز روی برگ، بین ارقام مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین تعداد لکه‌ی نکروز بر روی برگ رقم تکدانه مشهود مشاهده گردید. تعداد لکه‌های نکروز بعد از رقم تکدانه مشهد به ترتیب بر روی برگ رقم قاهری و صورتی کاهش پیدا کرد. بین سویه‌های جدا شده از میزبان‌های مختلف نیز از نظر تشکیل لکه نکروز روی برگ تفاوت معنی‌دار مشاهده می‌شود. در رقم تکدانه مشهد بیشترین تعداد لکه نکروز توسط سویه C1 و کمترین تعداد لکه توسط سویه IVIA773-1 ایجاد گردید. تمام سویه‌های مورد آزمایش بیشترین تعداد لکه نکروز را بر روی رقم تکدانه مشهد و کمترین تعداد لکه را بر روی رقم صورتی ایجاد کردند. رقم قاهری از این نظر در حد وسط قرار می‌گیرد. دو سویه‌ی A1 و W1 روی سه رقم مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار نداشتند. بیماری‌زایی روی برگ رقم قاهری با رقم صورتی در سه سویه اختلاف معنی‌دار داشت و تنها هنگامی که هر دو رقم با سویه‌ی C1 مایه‌زنی شدند، اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. سویه‌های PSS به تعداد بسیار زیادی از گیاهان حمله می‌کنند ولی به نظر می‌رسد که در برخی از میزبان‌ها بهتر تکثیر می‌یابند و مزیت میزبانی دارند (هیرانو و آپر ۱۹۹۰). گروهی از دانشمندان مزیت میزبانی را پذیرفته‌اند ولی گروهی دیگر اساساً آن را رد



در شکل ۵ نشان داده شده است.

میانگین طول ناحیه ی نکرóz شاخه در ارقام مختلف

گیلاس ۳۰ روز پس از مایه زنی با جدایه های مختلف *PSS*



شکل ۵- میانگین طول ناحیه نکرóz شاخه ارقام مختلف گیلاس ۳۰ روز پس از مایه زنی با جدایه های *PSS* (حروف متفاوت نشانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد می باشد).

همکاران ۱۹۹۵، سانتی و همکاران ۲۰۰۴). سیگنال های اولیه که نقش مهمی در تولید زهرابه سیرینگومایسین دارند گلوکزیدهای فنلی می باشند که در برگ ها، تنه و گل بسیاری از گیاهان مورد حمله *PSS* یافت می شود (مور و همکاران ۱۹۸۹، وانگ و همکاران ۲۰۰۶). بدفورد و همکاران (۲۰۰۳) نیز تنوع چشمگیری در واکنش ارقام مختلف گیلاس به شانکر باکتریایی مشاهده کردند. چنین تنوع گسترده ای در واکنش ارقام گیلاس در کشورهای مختلف نیز مشاهده شده است (سانتی و همکاران ۲۰۰۴، اسپاتس و همکاران ۲۰۱۰). نتایج تعدادی از ارزیابی های انجام شده در ایران نیز دلالت بر تنوع سطوح مقاومت نسبی ارقام مختلف گیلاس به این بیماری دارد (بوذری ۱۳۸۵). با توجه به طول ناحیه ی نکرóz شاخه و تعداد لکه های نکرóz ایجاد شده روی برگ می توان پی برد که حساسیت برگ و شاخه ارقام تکدانه مشهد، قاهری و صورتی به ترتیب کاهش می یابد. در مجموع بر اساس نتایج تحقیق حاضر، سطوح نسبی حساسیت شاخه و برگ ارقام مختلف گیلاس به بیماری شانکر باکتریایی متفاوت بود و همچنین بین حساسیت شاخه و برگ رابطه ی مستقیمی مشاهده شد.

همانگونه که مشاهده می شود از نظر این شاخص بین ارقام مختلف اختلاف معنی دار وجود دارد. زمانی که سویه C1 به شاخه ارقام مختلف مایه زنی شد، بیشترین طول ناحیه ی نکرóz در رقم تکدانه مشهد و کمترین طول در رقم صورتی مشاهده گردید. پس از مایه زنی سویه های IVIA773-1، W1 و A1، طول ناحیه ی نکرóz شاخه در ارقام تکدانه مشهد و قاهری اختلاف معنی داری نداشت. طول ناحیه ی نکرóz ایجاد شده توسط این سویه ها روی شاخه رقم صورتی به طور معنی داری از طول ناحیه ی نکرóz ایجاد شده بر روی شاخه ارقام تکدانه مشهد و قاهری کمتر بود. می توان گفت که شاخه ی رقم تکدانه مشهد حساسیت نسبتا بالا و شاخه ی رقم صورتی کم حساسیت نسبی کم را نسبت به سویه های *PSS* نشان داده است. تفاوت در ترکیبات مولکولی شاخه های گیاه از جمله ترکیبات قندی و فنلی موجب متفاوت بودن مقاومت شاخه ها در گیاهان، ارقام و یا حتی شاخه های مختلف یک درخت می شود به گونه ای که شاخه های جوان تر بخاطر بیشتر بودن این ترکیبات باعث فعال شدن ژن های پراآزاری بیمارگر و حساسیت بیشتر نسبت به بیمارگر می شود (اوگاو و

اختلاف معنی‌دار داشت. جمعیت سویه A1 در برگ رقم تکدانه مشهد، ۵ و ۷ روز پس از مایه‌زنی به طور معنی‌داری نسبت به رقم قاهری و صورتی افزایش یافت. همچنین جمعیت سویه C1 در برگ رقم تکدانه مشهد، ۳، ۵ و ۷ روز پس از مایه‌زنی به طور معنی‌داری نسبت به رقم قاهری و صورتی افزایش یافت. میزان افزایش جمعیت تمام سویه‌ها در روز دوم پس از مایه‌زنی در دو رقم قاهری و تکدانه مشهد در مقایسه با رقم صورتی معنی‌دار بود و میزان رشد جمعیت باکتری در برگ رقم صورتی کمتر بوده است. تمام باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق در فضای بین سلولی برگ‌های ارقام مختلف گیلاس تکثیر پیدا کردند. تفاوت‌هایی از نظر میزان تکثیر در بین سویه‌های مختلف که از میزبان‌های مختلف جدا شده بودند مشاهده گردید، ولی به طور کلی می‌توان گفت که برگ‌های رقم تکدانه مشهد میزبان مناسبی برای تکثیر باکتری *PSS* می‌باشند و نتایج روند رشد جمعیت باکتری با شدت بیماری در برگ هم‌خوانی داشته و در برگ‌هایی که جمعیت باکتری رشد بیشتری داشته شدت بیماری نیز بیشتر بود.

### بررسی دینامیک جمعیت جدایه‌های مختلف باکتری *PSS* در برگ ارقام مختلف گیلاس

برای بررسی نوسانات جمعیتی سویه‌های مختلف *PSS*، هر سویه به سه رقم مختلف گیلاس مایه‌زنی شد. مقایسه میانگین لگاریتم تعداد سلول زنده باکتری در هر گرم بافت برگ در جدول ۳ نشان داده شده است. در برگ‌های گیلاس رقم تکدانه مشهد تمامی سویه‌ها به خوبی رشد کردند. بررسی دینامیک جمعیت چهار سویه‌ی 1-IVIA773، W1، A1 و C1 در برگ سه رقم تکدانه مشهد، قاهری و صورتی نشان می‌دهد که جمعیت تمام سویه‌ها به مدت هفت روز پس از مایه‌زنی افزایش و پس از آن روند نزولی داشته است. رشد جمعیت باکتری در ارقام تکدانه مشهد و قاهری بیش از رقم صورتی می‌باشد (جدول ۳). از نظر شاخص جمعیت باکتری در بافت برگ جمعیت سویه 1-IVIA773 در برگ رقم تکدانه مشهد و قاهری به طور معنی‌داری در تمام بازه‌های زمانی نسبت به رقم صورتی بیشتر می‌باشد. این سویه در ارقام تکدانه مشهد و قاهری در همه‌ی بازه‌ها به جز بازه زمانی ۵ روز پس از مایه‌زنی اختلاف معنی‌دار نداشت. جمعیت سویه W1 در ارقام تکدانه مشهد و قاهری ۷ روز پس از مایه‌زنی نسبت به رقم صورتی

جدول ۳- لگاریتم تعداد سلول زنده جدایه‌های *PSS* در ارقام مختلف گیلاس در بازه‌های زمانی مختلف بعد از مایه‌زنی

سویه	رقم	روز پس از مایه‌زنی						
		۰/۵	۱	۲	۳	۵	۷	۱۴
IVIA	صورتی	۳±۰/۰۰۴ <sup>d</sup>	۵/۲۴±۰/۰۰۷ <sup>c</sup>	۶/۴۸±۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	۷/۳۳±۰/۰۰۸ <sup>g</sup>	۷/۵۲±۰/۰۰۴ <sup>de</sup>	۷/۵۳±۰/۰۰۴ <sup>de</sup>	۴/۰۴±۰/۰۰۲ <sup>f</sup>
	قاهری	۳/۳۰±۰/۰۰۶ <sup>ab</sup>	۵/۴۲±۰/۰۰۲ <sup>b</sup>	۶/۹۸±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۴۹±۰/۰۰۶ <sup>de</sup>	۷/۵۳±۰/۰۰۳ <sup>d</sup>	۷/۷۶±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۴/۳۹±۰/۰۰۵ <sup>e</sup>
	تكدانه	۳/۴۸±۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	۵/۴۸±۰/۰۰۴ <sup>ab</sup>	۷±۰/۰۰۲ <sup>ab</sup>	۷/۵۰±۰/۰۰۴ <sup>cde</sup>	۷/۶۰±۰/۰۰۶ <sup>c</sup>	۷/۷۴±۰/۰۰۱ <sup>c</sup>	۵±۰/۰۰۸ <sup>de</sup>
W1	صورتی	۳/۱۰±۰/۰۰۱ <sup>cd</sup>	۵/۲۳±۰/۰۰۴ <sup>c</sup>	۶/۸۰±۰/۰۰۲ <sup>a</sup>	۷/۳۲±۰/۰۰۶ <sup>g</sup>	۷/۴۴±۰/۰۰۵ <sup>f</sup>	۷/۴۹±۰/۰۰۸ <sup>e</sup>	۵/۲۲±۰/۰۰۸ <sup>b</sup>
	قاهری	۳/۳۰±۰/۰۰۳ <sup>ab</sup>	۵/۴۱±۰/۰۰۱ <sup>b</sup>	۷±۰/۰۰۹ <sup>ab</sup>	۷/۴۸±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۷۵±۰/۰۰۷ <sup>ab</sup>	۷/۷۱±۰/۰۰۱ <sup>c</sup>	۵/۲۲±۰/۰۰۲ <sup>bc</sup>
	تكدانه	۳/۴۷±۰/۰۰۷ <sup>a</sup>	۵/۵۳±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۷/۰۸±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۷/۵۴±۰/۰۰۷ <sup>abc</sup>	۷/۷۸±۰/۰۰۴ <sup>a</sup>	۷/۸۰±۰/۰۰۴ <sup>bc</sup>	۵/۴۱±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>
A1	صورتی	۳/۳۰±۰/۰۰۱ <sup>ab</sup>	۵/۴۰±۰/۰۰۵ <sup>b</sup>	۶/۸۸±۰/۰۰۵ <sup>c</sup>	۷/۳۳±۰/۰۰۶ <sup>g</sup>	۷/۴۶±۰/۰۰۹ <sup>ef</sup>	۷/۶۰±۰/۰۰۱ <sup>cd</sup>	۴±۰/۰۰۵ <sup>f</sup>
	قاهری	۳/۴۸±۰/۰۰۶ <sup>a</sup>	۵/۵۲±۰/۰۰۲ <sup>a</sup>	۶/۹۹±۰/۰۰۱ <sup>ab</sup>	۷/۵۳±۰/۰۰۱ <sup>abc</sup>	۷/۶۰±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۷۳±۰/۰۰۱ <sup>c</sup>	۴/۳۹±۰/۰۰۵ <sup>e</sup>
	تكدانه	۳/۴۸±۰/۰۰۸ <sup>a</sup>	۵/۵۹±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۷/۰۵±۰/۰۰۱ <sup>ab</sup>	۷/۵۵±۰/۰۰۷ <sup>ab</sup>	۷/۷۰±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۸۴±۰/۰۰۴ <sup>ab</sup>	۴/۵۴±۰/۰۰۳ <sup>ce</sup>
C1	صورتی	۳/۲۰±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۵/۳۱±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۶/۹۰±۰/۰۰۲ <sup>cd</sup>	۷/۴۰±۰/۰۰۱ <sup>f</sup>	۷/۴۹±۰/۰۰۱ <sup>cd</sup>	۷/۵۷±۰/۰۰۱ <sup>cd</sup>	۴/۳۹±۰/۰۰۵ <sup>de</sup>
	قاهری	۳/۴۲±۰/۰۰۵ <sup>a</sup>	۵/۴۹±۰/۰۰۲ <sup>ab</sup>	۷/۰۳±۰/۰۰۴ <sup>ab</sup>	۷/۵۲±۰/۰۰۱ <sup>bcd</sup>	۷/۶۲±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۷۴±۰/۰۰۳ <sup>c</sup>	۴/۴۸±۰/۰۰۴ <sup>de</sup>
	تكدانه	۳/۴۸±۰/۰۰۴ <sup>a</sup>	۵/۵۶±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۷/۰۷±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۷/۵۷±۰/۰۰۷ <sup>a</sup>	۷/۷۶±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۷/۸۸±۰/۰۰۱ <sup>bc</sup>	۴/۶۵±۰/۰۰۲ <sup>bc</sup>

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نمی‌باشند، از لحاظ آماری در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند. میانگین سه تکرار برای هر تیمار ± خطای استاندارد.

ژنتیکی جدایه‌ها و تفاوت میزبان اولیه باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بیماری شانکر درختان هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد می‌باشد. سویه‌های مختلف این باکتری از نظر برخی ویژگی‌های مورد بررسی مانند بیماری‌زایی روی میوه گیلاس و ایجاد نکروز روی برگ و شاخه ارقام مختلف تنوع نشان می‌دهند. از بین ارقام مختلف گیلاس مورد بررسی در این تحقیق، رقم تکدانه مشهد حساسیت نسبتاً بالا و رقم صورتی حساسیت نسبی کم را به بیمارگر *Pss* نشان دادند.

### سیاس‌گذاری

بدین وسیله از دانشگاه یاسوج جهت فراهم نمودن امکانات انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

جمعیت باکتری‌ها در واکنش سازگار می‌تواند در طول ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یابد و تعداد نهایی سلول‌های باکتری تا  $10^5$  برابر زادمایه اولیه افزایش یابد ولی در هم‌کنش‌های ناسازگار، افزایش جمعیت در طول دو تا چهار روز پس از مایه‌زنی حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر جمعیت اولیه افزایش می‌یابد (کلمو و لیچ ۱۹۹۰). مهم‌ترین تفاوت هم‌کنش سازگار و ناسازگار در دسترس بودن مواد غذایی برای سویه سازگار و عدم دسترسی آن برای سویه‌های ناسازگار می‌باشد (هیرانو و آپر ۱۹۹۰). سویه ناسازگار توانایی غلبه بر سیستم‌های دفاعی گیاه را ندارند و بنابراین تکثیرشان در فضای بین سلولی گیاه محدود می‌شود (هاچسون و همکاران ۲۰۰۱). در پژوهش حاضر واکنش بین سویه‌های مختلف و ارقام مختلف گیلاس سازگار بود ولی اختلاف رشد آن‌ها شاید به دلیل تفاوت فیزیولوژیکی و مولکولی ارقام گیلاس و حتی تنوع

### منابع

- بوذری ن، ۱۳۸۵. ارزیابی مقاومت ارقام گیلاس به بیماری شانکر باکتریایی. صفحه ۳۷۶ خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
- بی‌نام، ۱۳۹۲. آمارنامه جهاد کشاورزی. جلد سوم: محصولات باغی، ۱۶۷ صفحه.
- قاسمی، گوهرخای ش، بوذری ن، دشتکی ع ر و محمدی م، ۱۳۸۳. ارزیابی مقاومت نسبی برخی ارقام تجارتي گیلاس به شانکر باکتریایی و بررسی مارکرهای بیوشیمیایی مقاومت. موسسه‌ی تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ۹۵ صفحه.

Bedford KE, Sholberg PL and Kappel F, 2003. Use of detached leaf bioassay for screening sweet cherry cultivars for bacterial canker resistance. *Acta Horticulturae* 622: 365-368.

Bultreys A and Kaluzna M, 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology* 92: 21-33.

Bultreys A and Gheysen I, 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1904-1909.

- Endert E and Ritchie DF, 1984. Detection of pathogenicity, measurement of virulence and determination of strain variation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Disease* 68: 677-680.
- Gasic K, Prokic A, Ivanovic M, Kuzmanovic N and Obradovic A, 2012. Differentiation of *Pseudomonas syringae* Pathovars Originating from Stone Fruits. *Pesticides and Phytomedicine* 27: 219–229.
- Gross DC and De Vay JE, 1977. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiological Plant Pathology* 11: 13-28.
- Hirano SS and Upper CD, 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology* 28: 155-177.
- Hugh R and Leifson F, 1953. The taxonomic significant of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66: 24- 26.
- Hutcheson SW, Bretz J, Sussan T, Jin S and Pak K, 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *Journal of Bacteriology* 183: 5589–98.
- Kałużna M and Sobiczewski P, 2009. Virulence of *Pseudomonas syringae* pathovars and races originating from stone fruit trees. *Phytopathologia* 54: 71–79.
- Kelemu S and Leach JE, 1990. Cloning and characterization of an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 3: 59-65.
- Keller JD and Loescher WH, 1989. Nonstructural carbohydrate partitioning in perennial parts of sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114: 969-975.
- Kennelly MM, Cazorla FM, Vicente A, Ramos C and Sundin GW, 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees. Progress toward understanding and control. *Plant Disease* 91: 4-16.
- Klement Z, Frakes GL, Loverkovich L, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54 :74–477.
- Kovacs N, 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703.
- Lelliott RA, Billing E and Hayward AC, 1984. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 470-489.
- Little EL, Bostock RM and Kirkpatrick BC, 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3818-3823.
- Mo YY and Gross DC, 1991. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology* 173: 5784-5792.
- Mo YY, Geibel M, Bonsall RF and Gross DC, 1995. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L) leaves for plant signal molecules that activate the *syrB* gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* 107: 603-612.

- Moore RA, Starratt AN, Ma SW, Morris VL and Cuppels DA, 1989. Identification of a chromosomal region required for biosynthesis of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Canadian Journal of Microbiology 35: 910-917.
- Najafi Pour G and Taghavi SM, 2011. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from Different Hosts Based on Pathogenicity and BOX-PCR in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 431-442.
- Ogawa TM, Zehr E, Bird GW, Ritcher DF, Uriu K and Uyemoto JK, 1995. Compendium of Stone Fruit Tree Diseases. APS Press.
- Peters NK and Verma DPS, 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Molecular Plant-Microbe Interaction 3: 4-8.
- Quigley NB and Gross DC, 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the syrB and syrD genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. Molecular Plant-Microbe Interaction 7: 78-90.
- Santi F, Russell K, Me´nard M and Dufour J, 2004. Screening wild cherry (*Prunus avium*) for resistance to bacterial canker by laboratory and field tests. Forest Pathology 34: 349-362.
- Schaad NW, Jones JB and Chun W, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>th</sup> ed. APS Press.
- Scortichini M, Marchesi U, Dettori MT and Rossi MP, 2003. Genetic diversity, presence of the syrB gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. Plant Pathology 52: 277-286.
- Sorensen KN, Kim KH and Takemoto JY, 1998. PCR Detection of Cyclic Lipodepsinonapeptide-Producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and Similarity of Strains. Applied and Environmental Microbiology 64: 226-230.
- Spotts RA, Wallis KM, Serdani M and Azarenko AN, 2010. Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-Infection of horticultural and natural wounds and resistance of cultivar and rootstock combination. Plant Disease 94: 345-350.
- Vicente JG, Alves JP, Russell K and Roberts SJ, 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. European Journal of Plant Pathology 110: 337-351.
- Wang N, Lu SE, Yang Q, Sze SH and Gross DC, 2006. Identification of the syr-syp box in the promoter regions of genes dedicated to syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. Journal of Bacteriology 188: 160-168.
- Warren G and Wolber P, 1991. Molecular aspects of microbial ice nucleation. Molecular Microbiology 5: 239-243.

## Identification of the Causal Agent of Bacterial Canker of Stone Fruit Trees *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province and Comparison of Some Cherry Cultivars Resistance to it

M Erfaninik<sup>1</sup>, R Rezaei<sup>2\*</sup> and H Charehgani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Former MSc. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.

<sup>3</sup>Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University,

\*Corresponding author: rrezaei@yu.ac.ir

Received: 1 August 2017

Accepted: 17 June 2018

### Abstract

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*), the causal agent of bacterial canker of stone fruits, is a dangerous pathogen that attacks more than 200 different plant species. Due to the importance of disease, the purpose of this study was to identify the causal agent of the disease in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province and comparing the resistance of some cherry cultivars to this pathogen. During 2015-2016, 33 bacterial strains were isolated from stone fruit plants with canker, gummosis, and leaf spot symptoms from different regions of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province. Isolates were rod-shaped, motile, gram-negative, obligate aerobe, oxidase negative, catalase, levan and tobacco hypersensitive reaction positive, arginine dihydrolase and potato rot negative. The genes responsible for syringomycin synthesis (*syrB*) and syringomycin secretion (*syrD*) were detected in all isolates. All strains were able to produce necrosis spots on cherry fruit but showed different virulence. Regarding the phenotypic characteristics, pathogenicity test and PCR results of this study, all isolates were identified as *Pss*. To study the resistance of cherry plants, Takdaneh Mashhad, Ghaheri and Surati cultivars were selected. There was a significant difference between different cultivars, based on the number of the necrotic lesion on the leaf, length of the necrotic region on the branch and bacterial population in leaf tissue. Among the different cherry cultivars studied in this research, Takdaneh Mashhad cultivar was the most susceptible and Surati cultivar showed the least sensitivity to *Pss*.

**Keywords:** Bacteria, Pathogenicity, Toxin, Canker, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.