

تعیین ویژگی‌های فنوتیپی و گروه‌بندی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر زردآلو در استان آذربایجان شرقی با تکیه بر فعالیت هسته‌ی یخ

یلدا واصبی^۱، رضا خاکور^{۲*}، بوریس ویناتزر^۳، محمدمهدی فقیهی^۴ و عادل صابری وند^۵

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.
 - ۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.
 - ۳- استاد گروه علوم بیماری‌شناسی گیاهی، فیزیولوژی و علفهای هرز، دانشکده علوم گیاهی و محیط زیست، دانشگاه ویرجینیاتک، آمریکا.
 - ۴- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
 - ۵- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران.
- * مسئول مکاتبه khakvar@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱

چکیده

شانکر باکتریایی درختان میوه‌ی هسته‌دار یکی از مهم‌ترین بیماری‌های هسته‌داران در جهان می‌باشد. در سال‌های اخیر گسترش علائم شانکر همراه با ترشح صمغ و بلاست شکوفه در مناطقی از استان آذربایجان شرقی مشاهده گردیده است. از بافت‌های آلوده‌ی جوانه، شکوفه، شاخه و تنه‌ی درختان باغات زردآلو بر اساس آزمون‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گروه LOPAT و GATTa، جدایه‌های فلورسنت *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) جداسازی و شناسایی شدند. جدایه‌ها ترجیح میزبانی نداشته و با درجات مختلف پرآزاری روی سرشاخه‌های سبز بریده‌ی زردآلو و غلاف‌های لوبیاسبز بیماری‌زایی نشان دادند. در تمامی جدایه‌ها قطعه ۷۲۵ جفت‌بازی ژن *syfB* دخیل در سنتز زهرابه سیرینگوامیاسین ردیابی گردید و جدایه‌ها با اختلاف معنی‌داری از رشد رویشی پرگنه‌ی قارچ *Geotrichum candidum* با تولید زهرابه ممانعت کردند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده INAF/INAR بخشی از ناحیه‌ی ژنی *inaZ* تکثیر شد و فنوتیپ فعالیت هسته‌ی یخ با درجات مختلف در کلیه‌ی جدایه‌ها مشاهده گردید. با تعیین توالی بخشی از ناحیه 16S rRNA و ژن‌های *rpoD* و *inaZ* تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌ها با رسم تبارنما بر اساس روش بایزین مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در میان جدایه‌های *Pss* عامل شانکر زردآلو هم از لحاظ فنوتیپ بیماری‌زایی، سنتز زهرابه و تشکیل هسته‌ی یخ و هم از لحاظ ژنتیکی تنوع وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، تنوع، *rpoD*، *inaZ*.

مقدمه

Pseudomonas syringae pv. *syringae* یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای این درختان به‌شمار می‌رود (اگریوس و همکاران ۲۰۰۵). این بیماری برای اولین بار در ایران توسط بهار و همکاران (۱۳۶۱) روی درختان زردآلو در استان اصفهان گزارش گردید و تا به امروز از استان‌های مختلفی روی درختان میوه‌ی هسته‌دار گزارش شده است (شمس‌بخش و

استان آذربایجان شرقی با تولید ۱۶ درصد زردآلو، مقام اول تولید این محصول را در کشور به خود اختصاص داده است (احمدی و همکاران ۱۳۹۵). بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه‌ی هسته‌دار با عامل (*Pss*)

پروتئین دخیل در INA که خصوصیت تشکیل هسته‌ی یخ را به باکتری می‌دهد به‌وسیله ژن *ina* مستقر بر روی یک قاب قرائت^۲ کروموزومی به اندازه تقریباً ۳۶۰۰ جفت باز ساخته می‌شوند. پروتئین‌های هسته‌ی یخ در جدایه‌های *P. syringae* به‌خوبی شناسایی شده و شامل پروتئین‌های InaZ، InaV، InaQ و InaK می‌باشد (گرین و وارن ۱۹۸۵، شمید و همکاران ۱۹۹۷، جانگ و همکاران ۱۹۹۸). ژن *inaZ* مسئول فعالیت هسته‌ی یخ در جدایه‌های *Pss* می‌باشد. پروتئین‌های هسته‌ی یخ بر اساس ترکیب پروتئینی خود سطح فعالیت متفاوتی دارند و بر این اساس به سه کلاس A، B و C گروه بندی می‌شوند (پاتناک و همکاران ۱۹۹۷، لورو و همکاران ۲۰۱۴).

ژن 16S rRNA ناحیه‌ی حفاظت شده‌ای در گونه‌های مختلف باکتری می‌باشد که برای مطالعات تبارزایی و طبقه‌بندی در دهه‌های اخیر مورد استفاده بوده است (ویسبورگ ۱۹۹۱). با این حال محدودیت‌های آنالیز توالی این ژن و نداشتن تفکیک پذیری کافی در استنباط روابط تاکسونومیکی روشن میان باکتری‌ها، لزوم استفاده از سایر توالی‌های ژنی با قدرت تفکیک پذیری بالاتر از 16S rRNA را آشکار نمود. از این‌رو آنالیز توالی ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین از جمله ژن *gyrB* کدکننده‌ی DNA gyrase B، ژن *gapA* کد کننده‌ی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز^۳ (آنزیم کاتابولیکی در گلیگولیز)، ژن *gltA* یا *cts* کد کننده‌ی سیترات سینتاز و ژن *rpoD* کد کننده‌ی پروتئین سیگما فاکتور ۷۰ جهت تمایز و تاکسونومی گونه‌های سودوموناس مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که روابط تکاملی داخل گونه *P. syringae* را به خوبی توصیف می‌کند (هیوانگ و همکاران ۲۰۰۵). برگ و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از آنالیز توالی‌یابی چندژن‌گاهی^۴ با کاربرد چهار ژن خانه‌داری *cts*، *gapA*، *rpoD* و *gyrB*

رحیمیان ۱۳۷۶، خدایگان و همکاران ۱۳۹۱، رضایی و تقوی (۲۰۱۴). جدایه‌های مختلف *P. syringae* با حدود ۶۰ پاتووار توصیف شده روی حدود ۲۰۰ گونه از تیره‌ی مختلف گیاهی بیماری‌زا می‌باشند (یانگ ۲۰۱۰). این جدایه‌ها از طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زایی و پرازایی از جمله زهرابه‌ها، هورمون‌های گیاهی، پروتئین‌های اثرگذار و پروتئین‌های مولد هسته‌ی یخ در طول تعامل خود با میزبان استفاده می‌کند تا علائم بیماری را در میزبان‌های خود القاء نماید (هیوانگ و همکاران ۲۰۰۵).

نقش دماهای یخبندان در توسعه‌ی بیماری‌های ناشی از *P. syringae* روی درختان میوه جهت تعیین برنامه‌های کنترلی آن همواره مورد توجه بوده است. این دماها شدت آلودگی *Pss* روی برگ‌ها، شکوفه‌ها و شاخه‌های درختان میوه را افزایش می‌دهد چرا که فنوتیپ فعالیت هسته‌ی یخ^۱ (INA) توسط این باکتری‌ها، به سلول‌های باکتری این توانایی را می‌دهد که به عنوان هسته‌هایی عمل کرده و تشکیل بیولوژیک یخ را در دماهای بالاتر از دمای یخ‌زدگی تسریع کنند (لیندو ۱۹۸۳). نقش خسارت سرمازدگی در درختان میوه، به عنوان عامل مستعدکننده‌ی آلودگی شده است که فنوتیپ فعالیت هسته‌ی یخ به عنوان یک عامل پرازایی معرفی گردد. نقش فعالیت هسته‌ی یخ در پرازایی *Pss* نه تنها با خسارت آن روی شکوفه‌ها ارتباط دارد بلکه با تهاجم بعدی بیمارگر و آلودگی بافت‌ها نیز مرتبط می‌باشد (کنلی و همکاران ۲۰۰۷) چرا که این باکتری‌ها، با پائین آمدن دمای محیط باعث یخ‌زدن آب بین بافتی شده و در نتیجه اندام‌های حساس مانند جوانه و شکوفه که در تولید محصول نهایی نقش دارند، دچار سرمازدگی شده و از بین می‌روند (پرونیر و بوریجیا ۱۹۹۱). در وارپته‌های حساس، سرمازدگی معمولاً باعث خسارات شدید از جمله آلودگی سیستمیک و تشکیل شانکر می‌گردد. چرا که این باکتری‌ها، سازوکارهای مقاومتی گیاهان در برابر کاهش دما را شکسته و باعث یخ‌زدن آب در دماهای گرم‌تر از دمای معمول می‌شوند (کنستانتینیدو و همکاران ۱۹۹۱).

² Open reading frame (ORF)

³ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

⁴ Multilocus sequence typing (MLST)

¹ Ice nucleation activity (INA)

آب مقطر سترون تهیه و به آن ۴۰۰ میکرولیتر گلیسرول اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی

بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی، آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به منظور تشخیص و تفکیک جدایه‌های *Pss* انجام گرفت. آزمون‌ها شامل واکنش گرم در پتاس سه درصد، فعالیت کاتالازی، رشد هوازی/بی‌هوازی، تولید رنگدانه‌ی فلورسنت روی محیط KB، تولید لوان، اکسیداز، لهیدگی سیب‌زمینی، تولید آرژینین دی‌هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی توتون (آزمون‌های گروه LOPAT) و ذوب ژلاتین، هیدرولیز آسکولین، فعالیت تیروزینازی و مصرف تارتارات (آزمون‌های گروه GATTa) انجام شد (کواکس ۱۹۵۶، کلمنت و همکاران ۱۹۶۴، دای ۱۹۶۹، کرسترس و همکاران ۱۹۷۳، فاهی و پارسلی ۱۹۸۳، شاد و همکاران ۲۰۰۱).

آزمون‌های بیماری‌زایی

به منظور اثبات بیماری‌زایی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های *Pss* روی محیط کشت آگار غذایی، سوسپانسیون با غلظت 10^7 CFU/ml در آب مقطر سترون تهیه و با استفاده از سوزن سرنگ انسولین، به میزان یک میلی‌لیتر به زیر پوست سرشاخه‌های سبز یک ساله و بریده شده‌ی زردآلو در محل جوانه‌های شاخه و همچنین روی غلاف‌های لوبیا سبز سترون شده تزریق گردید (آیلو و همکاران ۲۰۱۵). نمونه‌های گیاهی تلقیح شده جهت حفظ رطوبت در داخل محفظه‌ی پلاستیکی در دمای ۲۸-۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. از آب مقطر سترون به عنوان نمونه‌ی شاهد منفی در آزمون استفاده گردید. سپس ظهور علائم با زخم‌های بافت‌مرده و پیشرفت آن در محل تزریق مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی تولید زهرا به سیرینگو مایسین در جدایه‌های *Pss*

جهت آزمون‌های ژنوتیپی استخراج DNA با استفاده از CTAB به روش دوپله و دوپله (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات

در میان ۲۱۶ جدایه *P. syringae* جدایه‌ها را به ۱۳ گروه فیلوژنتیکی حاوی ۲۳ خوشه مجزا طبقه‌بندی کردند. طی سال‌های اخیر بیماری شانکر درختان زردآلو مشکوک به آلودگی با عامل *Pss* در استان آذربایجان شرقی گسترش چشم‌گیری داشته است. از این رو در پژوهش حاضر تلاش گردید که ابتدا میزان ارتباط بیماری شانکر درختان زردآلو در مناطق نمونه‌برداری شده با جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* بررسی شود و سپس خصوصیات فنوتیپی و میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از ژن دخیل در تشکیل هسته‌ی یخ، *anaZ* بررسی شده و گروه‌بندی جدایه‌ها با گروه‌بندی بر اساس ترکیب دو ژنگاه 16S rRNA و *rpoD* مقایسه گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در بازدیدهای به عمل آمده طی اسفندماه ۱۳۹۳ و فروردین-ماه ۱۳۹۴ از باغات زردآلو در استان آذربایجان شرقی از جمله شهرستان‌ها و روستاهای مرند، میانه، عجب‌شیر، اسکو، اسفهان، سپیدان، سردرود، شبستر، خسروشهر، باسمنج، ایلیجی، آذرشهر و زینجان، نمونه‌هایی از شاخه، تنه و شکوفه‌های درختان دارای علائم شانکر و خروج صمغ از تنه و شاخه و بلاست شکوفه جمع‌آوری و در داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی رورستی، پنج گرم از بافت‌های گیاهی نمونه‌برداری شده به قطعات یک سانتی-متری بریده شده و در ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سترون یک دهم مولار به شدت به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط‌های کشت آگار غذایی (NA) و کینگ ب (King's B) حاوی سیکلوگزامید به-صورت چمنی کشت شد. تشنگ‌های پتری در دمای ۲۸-۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری و مشخصات پرگنه باکتری‌ها ثبت گردید. به منظور نگهداری کوتاه مدت، سوسپانسیون کدری از باکتری در آب مقطر سترون تهیه و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. برای نگهداری دراز مدت، سوسپانسیون کدری از باکتری در ۶۰۰ میکرولیتر

فوتیپ تولید زهرا به در جدایه‌ها با انجام آزمون زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسید. بدین منظور پس از تهیه‌ی سوسپانسیون از پرگنه‌ی ۲۴ ساعته باکتری به غلظت تقریبی 10^7 CFU/ml در آب مقطر سترون، جدایه‌ها به صورت خطی در یک طرف تشتک پتری حاوی محیط کشت Potato Dextros Agar (PDA) کشت شدند. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵-۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شده و سپس یک دیسک نیم سانتی‌متری از حاشیه‌ی فعال پرگنه‌ی ۴۸ ساعته قارچ *Geotrichum candidum* (اخذ شده از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز) به عنوان ارگانسیم شاخص، مقابل پرگنه باکتری کشت شد. تشکیل هاله‌ی بازدارنده در اطراف پرگنه باکتری پس از رسیدن رشد هیفی قارچ به لبه‌ی تشتک‌های پتری در شاهد نشان از تولید زهرا به تلقی گردید. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده شد (یانگ ۱۹۹۱).

بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی تشکیل هسته‌ی یخ در جدایه‌های *Pss*

به منظور ردیابی حضور ژن دخیل در تشکیل هسته‌ی یخ در جدایه‌های *Pss*، از تکثیر بخشی از ناحیه‌ی ژنی *inaZ* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده در پژوهش حاضر (5'-INAF (3'-TGCGTACCTGTGCAAATAACA و 5'-INAR (3'-ATGAAGTGTGACGCGCTGAT در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) (دستگاه ترموسایکلر شرکت peQlab، آلمان) استفاده شد. برنامه‌ی حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مرحله‌ی واسرشتگی مقدماتی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشتگی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس ۹۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال آغازگر در ۶۰ درجه‌ی سلسیوس ۱/۵ دقیقه، مرحله‌ی گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس سه دقیقه و مرحله‌ی گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

انجام شد. از پرگنه‌ی ۲۴ ساعته، جدایه‌های *Pss* کشت شده روی محیط NA در بافر CTAB دو درصد، سوسپانسیون تهیه شده و در حمام آب ۶۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت یک ساعت قرار گرفتند. سپس ترکیب کلروفم-ایزوامیل الکل به لوله‌ها اضافه و سانتریفیوژ انجام شد. روئشین حاصله به داخل لوله سترون جدید منتقل شده و به اندازه‌ی دو سوم حجم روئشین برداشت شده، ایزوپروپانول سرد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از انجام سانتریفیوژ، اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه شده و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. شستشوی رسوب با اتانول سه مرتبه انجام گرفت. میکروتیوب‌ها در دمای اتاق خشک شده و رسوب‌های DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شدند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه نانودراپ (شرکت Allsheng مدل Nano-200 ساخت چین) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام گرفت و در نهایت DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

به منظور تایید جدایه‌های *Pss*، از تکثیر بخشی از ناحیه‌ی ژنی رمزگذار زهرا به سیرینگومایسین با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی (5'-B1 (3'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG و 5'-B2 (3'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) (دستگاه ترموسایکلر شرکت peQlab، آلمان) استفاده شد (سورنسون و همکاران ۱۹۹۸). برنامه‌ی حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مرحله‌ی واسرشتگی مقدماتی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشتگی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس ۹۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال آغازگر در ۶۰ درجه‌ی سلسیوس ۱/۵ دقیقه، مرحله‌ی گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس سه دقیقه و مرحله‌ی گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

جهت تکثیر بخشی از ژن خانه‌داری *rpoD* استفاده شد (سرکار و گاتمن ۲۰۰۴). برنامه‌ی حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مرحله‌ی واسرشتگی مقدماتی در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشتگی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس ۱/۵ دقیقه، مرحله اتصال در ۶۳ درجه سلسیوس یک دقیقه، مرحله‌ی گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس دو دقیقه و مرحله‌ی گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس ۱۰ دقیقه اجرا گردید.

الکتروفورز محصولات PCR

برای مشاهده‌ی محصولات PCR و ردیابی قطعات DNA تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد و با استفاده از یک نشانگر وزنی و بافر TBE 1x انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی، از بافر رنگی FluoroDye (شرکت SMOBio، کره‌جنوبی) استفاده شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت در دمای اتاق روی ژل ران شدند. قطعات تکثیر شده تحت اشعه UV ایجاد شده توسط دستگاه ژل‌داک مشاهده شده و تصویر ژل ثبت گردید.

تعیین ترادف ژن‌ها

تمام جدایه‌های *Pss* جداسازی شده برای تعیین ترادف بخشی از ژن‌های *rpoD*، *16S rRNA* و *inaZ* به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی بین آن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات PCR جهت تعیین ترادف دو جهت به شرکت MacroGen (کره‌جنوبی) ارسال گردید. ترادف‌های به‌دست آمده پس از تعیین کیفیت با نرم‌افزار FinchTV v.1.4.0 و ویرایش بوسیله‌ی نرم‌افزار SeqMan™ II expert sequence analysis (DNASTAR National Inc., Madison, Wis.) در پایگاه اطلاعاتی Center for Biotechnology Information (NCBI) با برنامه (megablast) BLASTN با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. ترادف‌های *rpoD*، *16S rRNA* و *inaZ* باکتری‌های مرجع به‌کار رفته در بررسی تنوع بر

برای تعیین فعالیت هسته‌ی یخ از روش زدن قطرات استفاده شد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱). در این روش ابتدا پرگنه‌های ۲۴ ساعته باکتری‌ها روی محیط کشت KB حاوی ۱/۵ درصد گلیسرول کشت شده و در دمای ۲۵-۲۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر در آب مقطر سترون تهیه شده و از هر سوسپانسیون ۳۰ قطره ده میکرولیتری روی قایق‌های پارافینی به‌طور شناور داخل دستگاه cryobath منتقل شد. سرانجام تعداد قطرات یخ‌زده در هر جدایه با قرار گرفتن در معرض دماهای صفر، ۲-، ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰- و ۱۲- درجه‌ی سلسیوس ظرف مدت پنج دقیقه بررسی گردید. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده شد و آزمون سه مرتبه تکرار گردید.

تکثیر نواحی ژنی *rpoD* و *16S rRNA*

با استفاده از آغازگرهای (5'- FD1 (5'- rD1 AAGGAGGTGATCCAGCC-3') و (3'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (ویسبورگ و همکاران ۱۹۹۱)، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (دستگاه ترموسایکلر شرکت peqlab، آلمان) جهت تکثیر ناحیه‌ی داخلی ژن *16S rRNA* مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ی حرارتی و زمانی واکنش PCR به‌صورت مرحله‌ی واسرشتگی مقدماتی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس سه دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشتگی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس یک دقیقه، مرحله‌ی اتصال در ۵۵ درجه‌ی سلسیوس یک دقیقه و ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس دو دقیقه و مرحله‌ی گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس ۱۰ دقیقه اجرا گردید.

با استفاده از آغازگرهای (5'- rpoD-Fp (5'- AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG (3'- rpoD-Rp (5'- GGAACWKGCGCAGGAAGTCGGCAG (3'-

اجباری و کاتالاز منفی با داشتن پرگنه‌های محذب با حاشیه‌ی صاف به رنگ سفید تا بژ و لعابدار روی محیط NA حاوی ساکارز، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB بر اساس آزمون‌های گروه (+,-,-,+), LOPAT و (+,+,+,-), GATTA به عنوان جدایه‌های *Pss* شناسایی شدند (لیوت و همکاران ۱۹۶۶، گاردن و همکاران ۱۹۹۹). جدایه های *Pss* از نواحی جغرافیایی عجب‌شیر (Pss-26)، مرند (Pss-82)، سسپیدان (Pss-170، Pss-172، Pss-174، Pss-176)، میانه (Pss-240) و سردرود (Pss-181 و Pss-186) جمع‌آوری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

جدایه‌های *Pss* با القاء علامت شاخص HR یعنی تشکیل مناطق بافت‌مرده در محل تلقیح باکتری به‌عنوان جدایه‌هایی با واکنش مثبت در آزمون فوق حساسیت برای آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند (شکل ۱). جدایه‌های بیماری‌زا، ۱۴ روز پس از تلقیح در سطح سرشاخه‌های بریده و سبز زردآلو و لوبیا سبز، علایم بافت‌مردگی در مقایسه با شاهد منفی نشان دادند. بر اساس وسعت بروز علایم روی زردآلو، جدایه‌ها به دو گروه کم‌آزار با زخم‌های بافت-مردگی کم‌عمق (جدایه‌های Pss-172 و Pss-181) و پرآزار با زخم‌های بافت‌مردگی عمیق و وسیع در محل تلقیح (جدایه‌های Pss-26، Pss-82، Pss-170، Pss-174، Pss-176، Pss-186 و Pss-240) تقسیم شدند. روی غلاف لوبیا سبز جدایه Pss-82 با تشکیل زخم‌های بافت‌مردگی قهوه‌ای تیره رنگ بزرگ به قطر تقریبی سه میلی‌متر به عنوان جدایه‌ی پرآزار و سایر جدایه‌ها با تشکیل زخم‌های بافت‌مردگی به قطر تقریبی یک میلی‌متر در محل تلقیح به عنوان جدایه‌های کم‌آزار شناسایی شدند. آزمون کخ با جداسازی مجدد جدایه‌های *Pss* از گیاهان مایه‌زنی شده روی محیط KB و شناسایی و تایید جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام گرفت.

مبنای حداکثر هم‌ردیفی با ترادف‌های مورد مطالعه با ارزش مورد انتظار (e-value) نزدیک به صفر در تحقیق حاضر انتخاب شدند. ترادف‌های ویرایش شده با استفاده از روش MUSCLE (ادگار ۲۰۰۴) در نرم‌افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA 6 (تامورا و همکاران ۲۰۱۳) هم‌ردیف‌سازی شدند.

ترسیم تبارنماها

فاصله‌ی ژنتیکی توالی جدایه‌های مختلف و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها با یکدیگر و همچنین با تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک ژن، بر مبنای استنتاج بایزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v.3.2.2 و الگوریتم مونت کارلو چین مارکوف (Markov Chain Monte Carlo) (MCMC) با میانگین انحراف معیار نرخ تقسیم ۰/۰۱، با ایجاد ۱۰۰۰۰۰۰۰ نسل و ذخیره یک تبارنما در هر ۱۰۰۰ نسل ترسیم شدند. پس از چشم‌پوشی از اولین ۲۵ درصد نسل‌ها به عنوان معیار burn-in، مابقی ۷۵ درصد تبارنماهایی که در هر نسل ذخیره شده بودند، به صورت تبارنمای اجمالی همراه با مقادیر مربوط به توزیع احتمال پسین (posterior probability) ارایه شدند (رانکوئیست و همکاران ۲۰۱۲). بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدها برای هر ژنگاه با استفاده از معیار اطلاعاتی آکائیک (Akaike Information Criterion-AIC) (آکائیک ۱۹۷۴) و نرم-افزار MrModeltest v. 2.3 (نیلاندر ۲۰۰۴) اجرا گردید. تبارنماهای ترسیم شده با استفاده از برنامه FigTree (v1.4.2) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) مشاهده شدند.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

از میان ۲۹۳ جدایه‌ی باکتریایی جداسازی شده از درختان زردآلو با علایم شاخص شانکر تنه و شاخه و ترشح صمغ همراه با بلاست شکوفه، تنها نه جدایه هوازی

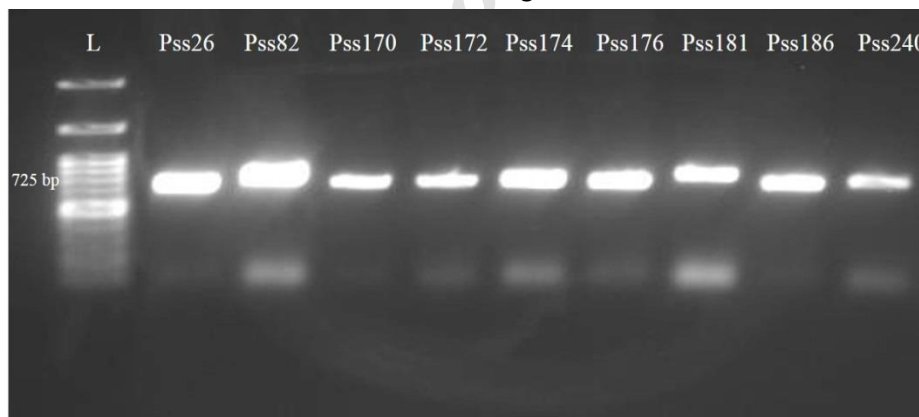


شکل ۱- علایم بافت مردگی روی شاخه‌ی سبز زردآلو (a) و غلاف لویباسبز (b) توسط جدایه پرازار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss-82 در آزمون بیماری‌زایی.

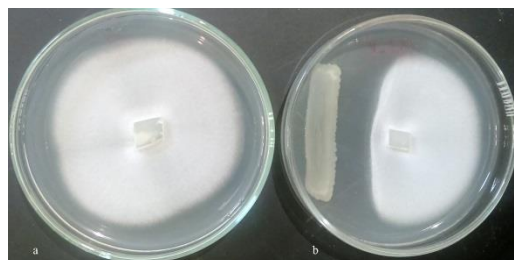
G. candidum روی محیط کشت PDA بازاری کردند (شکل ۳). جدایه‌های بیمارگر در این آزمون خصوصیات متفاوتی نشان دادند. جدایه‌ی بیمارگر Pss-181 با تشکیل بزرگ‌ترین هاله‌ی بازدارنده و جدایه Pss-172 با تشکیل کوچک‌ترین هاله‌ی بازدارنده، به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در مهار رشد رویشی پرگنه‌ی قارچ را داشتند.

بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی تولید زهرابه سیرینگومایسین

ژن *syrB* کدکننده‌ی زیرواحد ۱۲۰۰ کیلودالتونی زهرابه سیرینگومایسین با استفاده از آغازگرهای B1/B2 در تمامی جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* با تکثیر قطعه‌ی ژنی به اندازه ۷۲۵ جفت‌بازی ردیابی گردید (شکل ۲). تمامی نه جدایه *Pss* از طریق تولید زهرابه سیرینگومایسین یا برخی از ایزومرهای آن با تشکیل هاله‌ی بازدارنده از رشد قارچ



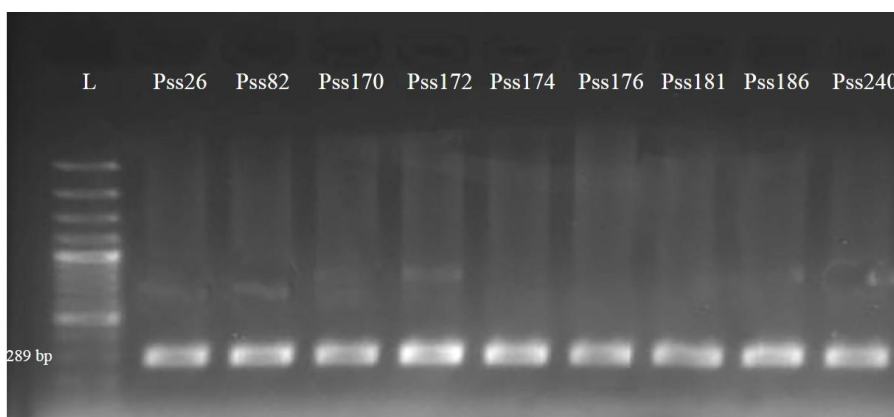
شکل ۲- تکثیر قطعات مورد انتظار DNA به اندازه ۷۲۵ جفت باز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B1 و B2 در جدایه‌های مختلف (*Pss*) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: L: نشانگر DNA.



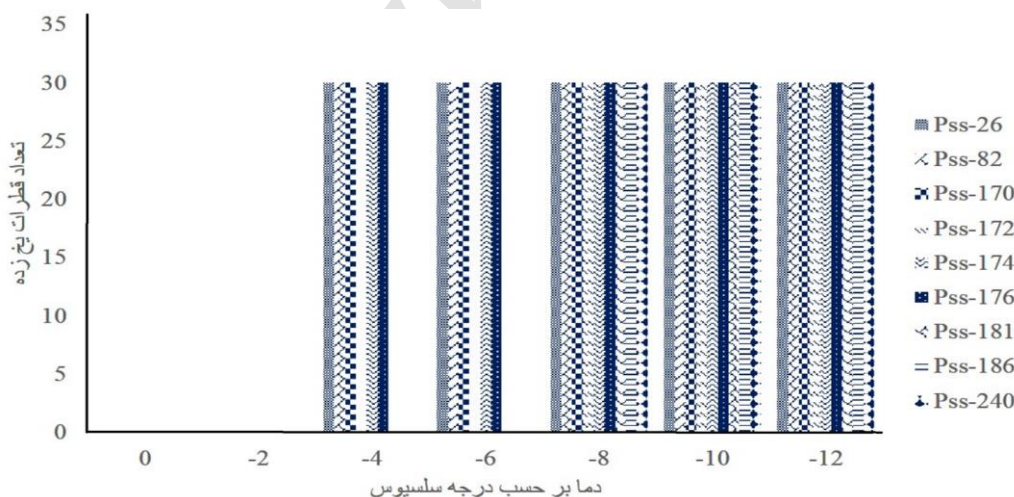
شکل ۳- آزمون زیست‌سنجی تولید زهرابه سیرینگومایسین توسط جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با بازاری رشد رویشی قارچ *Geotrichum candidum*: a: رشد پرگنه قارچ در شاهد منفی، b: آزمون کشت متقابل با هاله بازدارنده.

Pss-26، Pss-82، Pss-170، Pss-174 و Pss-176 با تشکیل اولین قطرات یخ‌زده، در دمای ۴- درجه‌ی سلسیوس از جدایه‌های Pss-172، Pss-181، Pss-186 و Pss-240 با تشکیل قطره‌ی یخ‌زده در دمای ۸- درجه‌ی سلسیوس متمایز شدند (شکل ۵).

بررسی ژنوتیپی و فنوتیپی تشکیل هسته‌ی یخ با استفاده از آغازگرهای طراحی شده‌ی INAF/INAR قطعه ۲۸۹ جفت‌بازی بخشی از ناحیه‌ی داخلی ژن مولد هسته یخ *inaZ* در تمامی جدایه‌های *Pss* تکثیر و ردیابی شد (شکل ۴). تمامی جدایه‌های *Pss* با درجات مختلف قادر به تشکیل هسته‌ی یخ بودند. در میان جدایه‌ها، جدایه‌های



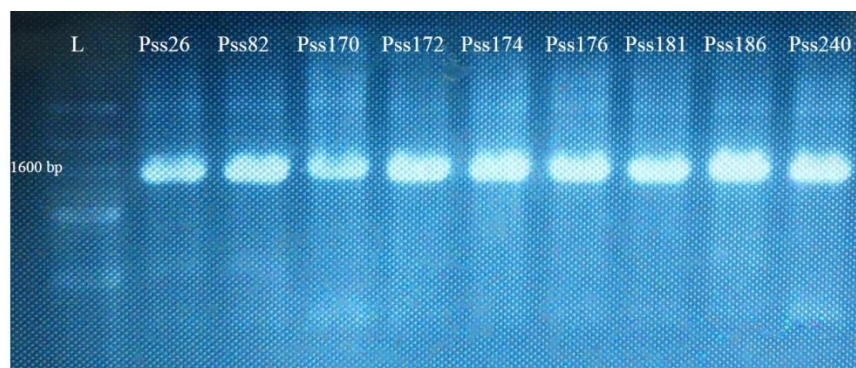
شکل ۴- تکثیر قطعات مورد انتظار DNA به اندازه ۲۸۹ جفت باز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی INAF و INAR در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*): L نشانگر DNA



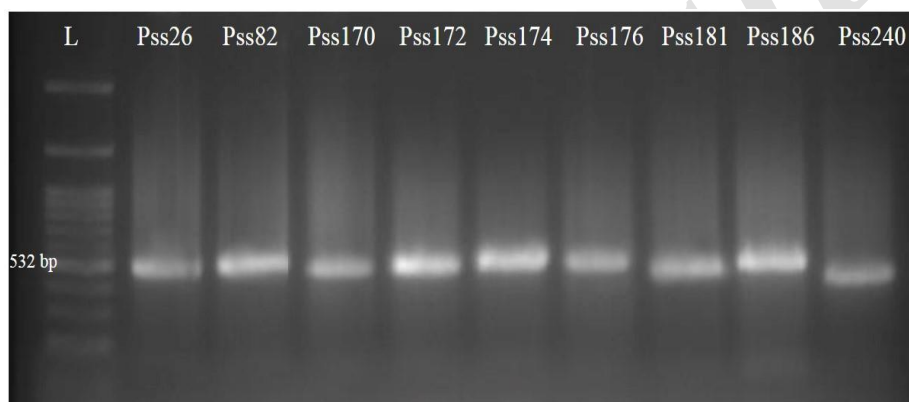
شکل ۵- نمودار تعداد قطرات یخ‌زده‌ی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) در دماهای مورد آزمون.

(شکل ۶). ژن سنتز کننده‌ی RNA پلی‌مراز سیگما فاکتور *rpoD*، با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۵۳۲ جفت‌بازی در تمامی جدایه‌ها ردیابی شد (شکل ۷).

ردیابی نواحی ژنی 16S rRNA و *rpoD* در جدایه‌ها با استفاده از آغازگر عمومی rD1/fD1 قطعه‌ی حدود ۱۶۰۰ جفت‌بازی در جدایه‌های *Pss* تکثیر و ردیابی گردید



شکل ۶- تکثیر قطعات مورد انتظار DNA به اندازه ۱۶۰۰ جفت باز با استفاده از آغازگرهای rD1 و fd1 در جدایه های مختلف (Pss)
Pseudomonas syringae pv. syringae: L: نشانگر DNA.



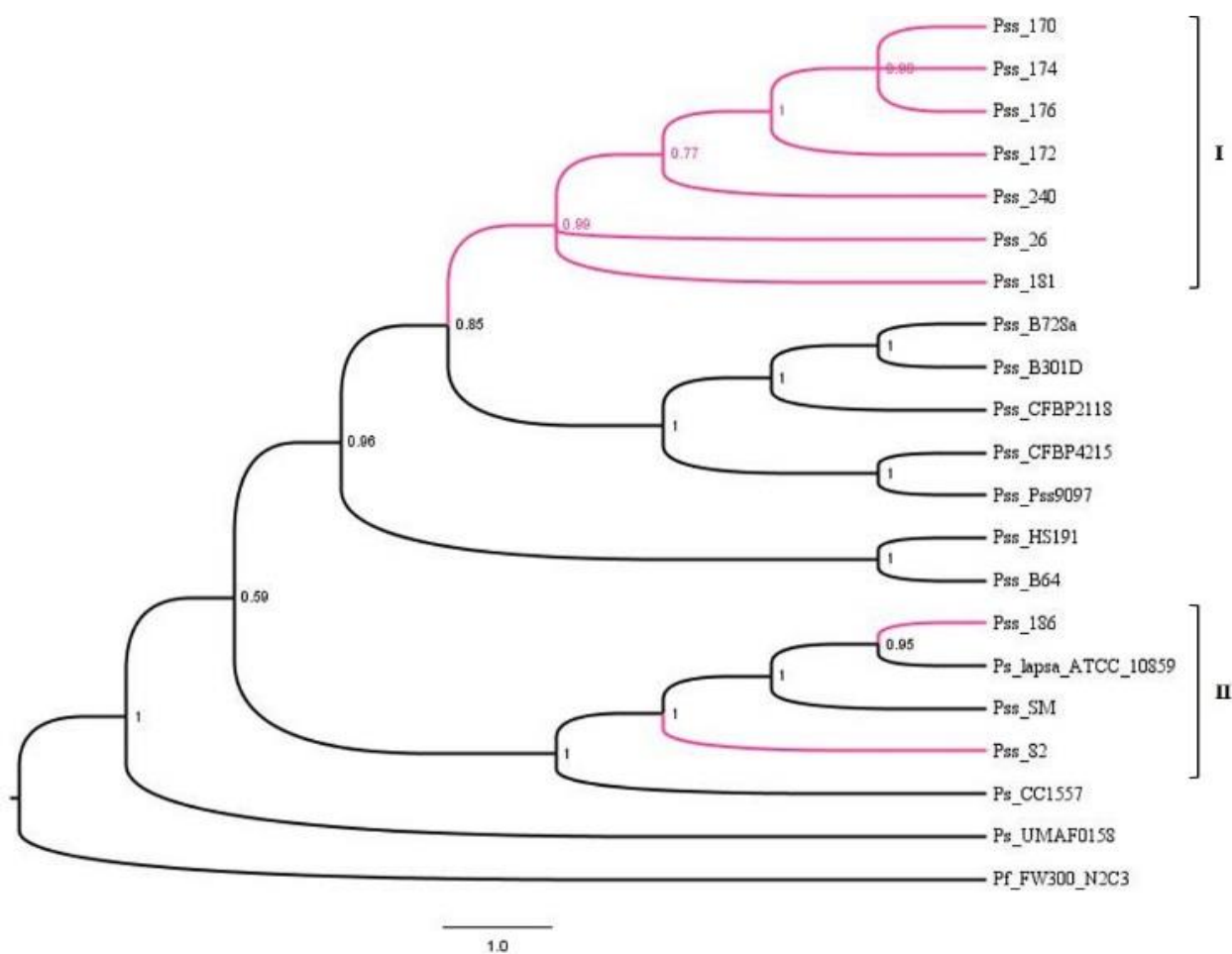
شکل ۷- تکثیر قطعات مورد انتظار DNA به اندازه ۵۳۲ جفت باز با استفاده از آغازگرهای rpoD-Fp و rpoD-Rp در جدایه های مختلف
Pseudomonas syringae pv. syringae (Pss): L: نشانگر DNA.

به ترتیب مدل Kimura (K80) و General Time Reversible with Gamma distribution and proportion of Invariant sites (GTR+G+I) تعیین شد و تبارنماهای ترسیم شده با حداکثر احتمال پسین حمایت شدند. نتایج تجزیه و تحلیل تبارنماهای ترسیم شده برای ژنگاه *inaZ* و ترکیب ژنگاه های 16S rRNA و *rpoD* نشان داد که در تبارنمای به دست آمده جدایه ها با حداکثر احتمال پسین به ترتیب به دو و سه گروه گروه بندی شدند. در تبارنمای ترسیم شده بر اساس ژنگاه *inaZ*، جدایه های Pss-26، Pss-170، Pss-172، Pss-174، Pss-176، Pss-181 و Pss-240 در گروه I و جدایه های Pss-82 و Pss-186 در گروه II گروه بندی شدند (شکل ۸). در گروه II جدایه های ایرانی در کنار جدایه های مرجع اخذ شده از بانک ژن

تعیین ترادف DNA و بررسی تنوع جدایه ها
 نتایج توالی یابی، تأییدکننده نتایج شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه های Pss بود. تمامی نه جدایه Pss جهت تعیین توالی ژن های 16S rRNA، *rpoD* و *inaZ* مورد استفاده قرار گرفتند. ارتباط تبارزایی جدایه های مورد نظر بر اساس تعیین ترادف ژن های فوق و مقایسه با دیگر ترادف های موجود در بانک ژن انجام گرفت. در تعیین ترادف بخشی از ژن های 16S rRNA، *rpoD* و *inaZ* در جدایه های به دست آمده از زردآلو، قطعاتی به طول متوسط ۱۱۳۲، ۵۵۱ و ۲۷۷ جفت باز به دست آمد. ترادف های ویرایش شده با ترادف های به دست آمده از بانک ژن، NCBI هم تراز شدند. بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدها برای ژنگاه *inaZ* و ترکیب ژنگاه های 16S rRNA و *rpoD*

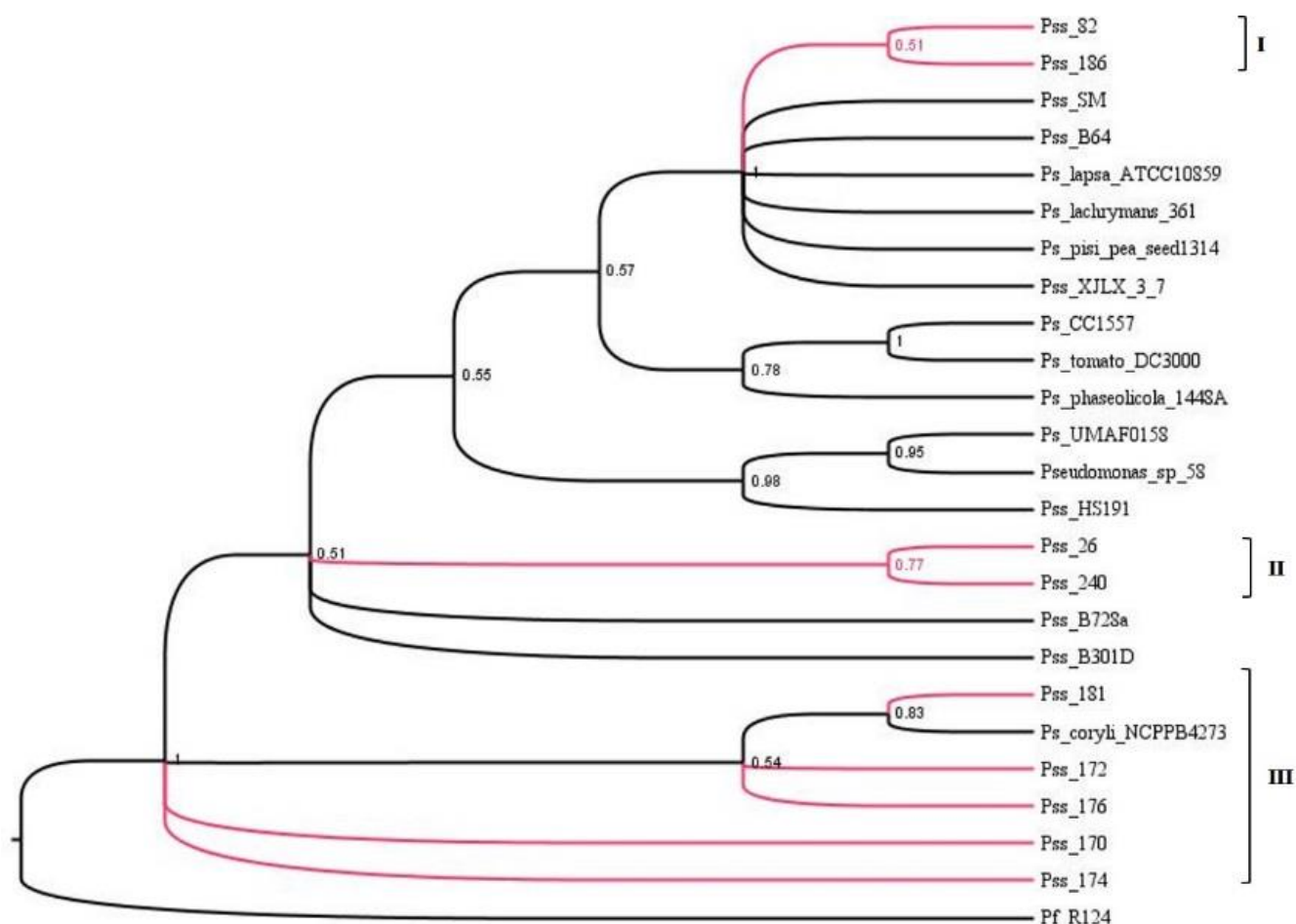
گروه‌بندی شدند. در گروه I دو جدایه Pss-82 و Pss-186، در گروه II جدایه‌های Pss-26 و Pss-240 و در گروه III جدایه‌های Pss-170، Pss-172، Pss-174، Pss-176 و Pss-181 گروه‌بندی شدند (شکل ۹).

NBCI خوشه‌بندی شدند. جدایه‌های موجود در گروه I با حداکثر احتمال پسین ۰/۸۵ از نزدیک‌ترین خوشه متمایز شدند. در تبارنمای ترسیم شده بر اساس ترکیب دو ژنگاه *rpoD* و 16S rRNA جدایه‌ها در سه گروه I، II و III



شکل ۸- تبارنمای ترسیم شده بر اساس ترادف‌های هم‌تراز بخشی از ژن *inaZ* با روش Bayesian inference و مدل K80. جدایه‌های ایرانی با شاخه‌های قرمز رنگ مشخص شده‌اند. خطوط سیاه پررنگ در سمت راست نشان‌دهنده‌ی گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی می‌باشند. Pss:

Pseudomonas syringae :Ps *Pseudomonas fluorescens* :Pf *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*



شکل ۹- تبارنمای ترسیم شده بر اساس ترادف‌های هم‌تراز و ترکیب شده بخشی از ژن‌های 16S rRNA و *rpoD* با روش Bayesian inference و مدل GTR+G+I. جدایه‌های ایرانی با شاخه‌های قرمز رنگ مشخص شده‌اند. خطوط سیاه پررنگ در سمت راست نشان‌دهنده‌ی

گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی می‌باشند. Pss: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Pf: *Pseudomonas fluorescens*; Ps: *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae

بحث

و هلو در مناطق اهر، شبستر و کلیبر و عبدالهی (۱۳۹۴) روی درختان زردآلو در منطقه‌ی مرند و میانه در استان آذربایجان شرقی گزارش کرده‌اند. در پژوهش حاضر نه جدایه‌ی تولید کننده‌ی رنگدانه فلورسنت روی محیط KB و به خاطر تولید لوان، عدم تولید اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز، نداشتن توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و ایجاد فوق حساسیت در برگ‌های توتون (آزمون گروه LOPAT) جزء گروه یک سودوموناس‌ها بوده و به عنوان

بیماری‌های درختان میوه‌ی هسته‌دار ناشی از پاتووارهای *P. syringae* به عنوان شانکر، گموز، بلاست شکوفه، مرگ سرشاخه، بلایت جوانه و سرشاخه و نکروز انتهایی نیز شناخته می‌شود (اگریوس ۲۰۰۵). بیماری شانکر درختان میوه‌ی هسته‌دار با عامل *Pss* در ایران از استان‌های مختلفی گزارش شده است. عباسی و همکاران (۱۳۹۲) وجود بیماری را روی درختان زردآلو، گیلاس، آلو

جدایه پرآزار شناسایی گردید. از این نتایج میتوان نتیجه گرفت که لوبیاسبز می‌تواند به عنوان یک میزبان ثانوی برای جدایه‌های *Pss* جداسازی شده از زردآلو در منطقه‌ی نمونه‌برداری شده محسوب شود. در آزمون بیماری‌زایی، طول زخم‌های بافت‌مردهی ایجاد شده توسط جدایه‌های *Pss* جدا شده از درختان میوه‌ی هسته‌دار روی شاخه‌های هلو توسط محمودی و همکاران (۱۳۹۰) متغیر گزارش شده است. در حالی که عباسی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که جدایه‌های *Pss* جداسازی شده از درختان میوه‌ی هسته‌دار (هلو، شلیل، زردآلو، آلو و گیلاس) از درجات بیماری‌زایی مشابه و بالایی روی ساقه‌ی نهال‌های هلو برخوردار بودند.

جدایه‌های بیمارگر در مهار رشد رویشی قارچ *G.candidum* تفاوت نشان دادند. نتایج فوق با یافته‌های مطالعات محمودی و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت داشت. بعلاوه همبستگی بین مهار رشد رویشی قارچ و بیماری‌زایی جدایه‌ها وجود نداشت. به‌طوری که مشاهده گردید جدایه‌هایی با اعمال بیشترین بازدارندگی علیه قارچ، در آزمون بیماری‌زایی علایم بافت‌مردده هم شدید و هم خفیف را نشان دادند. ژن‌های دخیل در سنتز و ترشح سیرینگومایسین در جدایه‌های *Pss* و جدایه‌های غیربیماری‌زای رورستی وابسته به آن، ژن‌های ضروری و مهمی می‌باشند چراکه تولید زهرابه سیرینگومایسین توسط جدایه‌های *Pss* عامل مهمی در پرآزاری بیمارگر محسوب می‌شود. ژن *svrB* در میان جدایه‌های *Pss* حفاظت شده می‌باشد. از آنجایی که این ژن در سنتز لیپودپسی‌نوناپپتیدهای حلقوی نقش دارد به عنوان ابزار مناسبی برای شناسایی تولیدکنندگان این زهرابه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تفاوت در ترادف نوکلئوتیدهای این ژن محققان را بر آن داشته است تا با استفاده از این خصوصیت به شناسایی و گروه‌بندی جدایه‌های تولیدکننده‌ی زهرابه‌های لیپودپسی‌پپتیدهای حلقوی بپردازند (خو و گروس ۱۹۸۸، کیگلی و گروس ۱۹۹۴، ژانگ و همکاران ۱۹۹۵، سورنسن و همکاران ۱۹۹۸)

گونه *P.syringae* شناسایی شدند. همچنین بر اساس آزمون‌های گروه *GATTa*، ذوب ژلاتین و هیدرولیز آسکولین مثبت و مصرف تارتارات و فعالیت تیروزینازی منفی بود که این ویژگی‌ها با خصوصیات پتووار *syringae* مطابقت داشت (پالرونی ۱۹۸۴). در پژوهش حاضر به دلیل پایین بودن تعداد جدایه‌های *Pss* جداسازی و شناسایی شده علی‌رغم وسعت آلودگی منطقه به علایم شانکر همراه با ترشح صمغ و بلاست شکوفه، احتمال می‌رود که بسیاری از این علائم مرتبط با بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه‌ی هسته‌دار با عامل *Pss* نبوده و ممکن است عواملی از جمله مشکلات تغذیه‌ای و فیزیولوژیک و یا سایر عوامل باکتریایی و حتی قارچی و مخمری در بروز علایم شانکر و ترشح صمغ در درختان زردآلو در مناطق نمونه-برداری شده دخیل باشند. علی‌رغم پراکنش وسیع شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ناشی از *Pss* در نقاط مختلف ایران (عباسی و همکاران ۲۰۱۳) گزارشاتی مبنی از بروز شانکر هسته‌داران توسط سایر عوامل باکتریایی و همچنین عوامل مخمری در ایران وجود دارد. دهقان‌نیری و همکاران (۱۳۹۵) مخمر *Cryptococcus magnus* را به عنوان عامل شانکر ساقه درختان زردآلو، آلو، آلوچه، آلبالو، هلو، شلیل، بادام و گیلاس در استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، قم و یزد معرفی کردند. برهانی و رحیمیان (۲۰۱۶) گزارش نمودند که عامل ایجادکننده‌ی علایمی مشابه با علایم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه‌ی هسته‌دار ناشی از باکتری *Pss* روی درختان هلو و شلیل در نقاطی از استان خراسان مخمرهای *C. magnus* و *C. adeliensis* می‌باشند.

جدایه‌های به‌دست آمده از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی اختلافات بسیار جزیی داشته و تنوعی در میان جدایه‌ها نمایان نشد. نتایج این آزمون‌ها با مطالعات انجام شده توسط جونز و همکاران (۱۹۹۳) روی جدایه‌های *Pss* مطابقت داشت. در آزمون بیماری‌زایی، جدایه‌ها درجات مختلفی از پرآزاری را نشان دادند. در این آزمون جدایه *Pss-82* روی هر دو میزبان زردآلو و لوبیاسبز به عنوان

ترغیب نموده است (ناتالینی و همکاران ۲۰۰۶، راویندرا و همکاران ۲۰۱۵). بررسی خوشه‌ای جدایه‌ها در پژوهش حاضر بر پایه روش بایزین نشان داد که در میان جدایه‌های *Pss* بر اساس ژن مولد هسته‌ی یخ تنوع ژنتیکی وجود دارد و بر این اساس جدایه‌ها به دو گروه کاملاً مجزای I و II تقسیم شدند. در میان جدایه‌های *Pss* به دست آمده از یک منطقه نیز تنوع وجود داشته به طوری که جدایه‌های سردرود حداکثر تمایز را نشان داده و در گروه‌های متمایز قرار گرفتند. در میان جدایه‌های گروه I نیز تنوع وجود داشته و جدایه‌ها در زیرگروه‌های مجزا قرار گرفتند. با این حال جدایه‌های ایرانی قرارگرفته در گروه I از جدایه‌های مرجع واقع در نزدیک‌ترین خوشه با احتمال بالایی مجزا شدند. بین آزمون فنوتیپی تشکیل قطرات یخ‌زده و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ژن *inaZ* همبستگی وجود نداشت. به طوری که جدایه‌هایی با تشکیل قطرات یخ‌زده در دمای متفاوت در یک گروه قرار گرفتند. این حالت در هر دو گروه ایجاد شده در تبارنمای به دست آمده بر اساس ژن *inaZ* صادق می‌باشد.

توپوگرافی دندروگرام ترسیم شده بر اساس ترکیب دو ژنگاه *rpoD* و *16S rRNA* با توپوگرافی دندروگرام حاصله از ژن *inaZ* تفاوت نشان داد. در تبارنمای به دست آمده بر اساس ترکیب دو ژنگاه، جدایه‌ها در سه گروه مجزا طبقه‌بندی شدند. در این تبارنما نیز هیچ گونه همبستگی بین گروه‌بندی جدایه‌ها و مناطق جغرافیایی وجود نداشت. به طوری که جدایه‌های به دست آمده از سردرود همچون تبارنمای حاصله از ژن *inaZ* بیشترین تنوع را نشان داده و در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند. جدایه‌های *Pss-26* و *Pss-240* به دست آمده از عجب شیر و میانه بیشترین شباهت را به هم داشته و در یک گروه قرار گرفتند. بررسی ترادف ژن رمزگذار پروتئین، *rpoD*، با داشتن یک کپی در ژنوم باکتری‌ها، جهت تمایز و تاکسونومی گونه‌های سودوموناس اولین بار توسط یاماموتو و همکاران (۲۰۰۰) پیشنهاد گردید. ژن *rpoD*، پروتئین ۷۰ کیلودالتونی سیگما فاکتور ۷۰ را کد می‌کند که

سویه‌هایی از باکتری‌های *Pseudomonase syringae*، *Pantoea agglomerans*، *Pseudomonas fluorescens* و *Xanthaomonas spp.* به عنوان باکتری‌های مولد هسته‌ی یخ شناسایی شده‌اند. این باکتری‌ها با فعالیت و افزایش جمعیت خود در سطح گیاهان، به وقوع سرمازدگی در دماهای بالاتر از معمول کمک می‌کنند به عبارت دیگر باعث یخ زدن آب در دماهای گرم‌تر از دمای معمول می‌شود. بسیاری از سویه‌های *P. syringae* پروتئین یخ‌سازی در سطح سلول‌های خود تولید می‌کنند. این پروتئین به وسیله ژن *inaZ* کد می‌شود. پروتئین *InaZ* با موتیف بسیار حفاظت‌شده در غشاء خارجی دیواره‌ی سلولی باکتری قرار گرفته است. در پژوهش حاضر تمامی جدایه‌های *Pss* مورد آزمون قادر به تشکیل قطرات هسته‌ی یخ با درجات مختلف بودند و ژن *inaZ* در تمام جدایه‌ها ردیابی گردید. حفاظت-شدگی ژن‌های *ina* در میان گونه‌ها و جنس‌های مختلف باکتری منجر به این فرضیه شده است که این ژن‌ها به صورت افقی در میان گونه‌ها و جنس‌های باکتریایی منتقل شده اند در حالی که تنها یک مرتبه تکامل یافته اند (ادوارز و همکاران ۱۹۹۴). نتایج نشان داد که بین صفت تشکیل هسته‌ی یخ و شدت بیماری‌زایی همخوانی وجود دارد. به طوری که در آزمون یخ‌زدگی جدایه‌های پرآزار *Pss-26*، *Pss-82*، *Pss-170*، *Pss-174* و *Pss-176* در برودت کمتری نسبت به جدایه‌های کم‌آزار قطرات هسته‌ی یخ را تشکیل دادند. این خصوصیات همراه با نقش ژن *inaZ* در پرآزاری جدایه‌های *Pss* ما را بر آن داشت تا در پژوهش حاضر از توالی‌یابی بخشی از ژن *inaZ* در گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده گردد.

در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده، شباهت جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و حتی الگوی پروتئینی، محققان را به سوی استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR همچون روش‌های مبتنی بر انگشت‌نگاری DNA و تکنیک MLST که ثبات و کارایی لازم برای گروه‌بندی و تعیین روابط تبارزایی میان جدایه‌های باکتریایی موجود در یک گروه را دارا هستند،

و بقاء روی شکوفه‌ها و برگ‌های سالم در کل فصل رویشی با توانایی تشکیل هسته‌ی یخ و از اینرو کاهش دمای سرمازدگی گیاهان، از عوامل تشدید کننده‌ی سرمازدگی و وقوع شانکر درختان میوه‌ی هسته‌دار می‌باشند. طاهری و همکاران (۱۳۹۴) با شناسایی و تخمین جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ جداسازی شده از درختان میوه‌ی هسته‌دار در استان خراسان رضوی، جدایه‌های *P. syringae* را به عنوان فراوان‌ترین و قوی‌ترین باکتری مولد هسته‌ی یخ روی درختان میوه هسته‌دار معرفی کردند و تایید کردند که بین علایم شانکر، خسارت سرمازدگی و جمعیت باکتری‌های مولد هسته‌ی یخ رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد. به گزارش لیندو و کونل (۱۹۸۴) تیمار درختان میوه با استفاده از ترکیبات مسی باعث کاهش جمعیت باکتری‌ها و فعالیت هسته یخی باکتری‌ها شده و خسارت سرما به درختان میوه را کاهش می‌دهد.

پروتئین ویژه شروع کننده‌ی رونویسی RNA پلی‌مراز می‌باشد (لونتو و همکاران ۱۹۹۲، فوجیتا و همکاران ۱۹۹۵). این پروتئین منحصر به فرد در باکتری‌ها با تعداد زیادی محل‌های چند شکل پراکنده در طول ترادف ژنوم، نشانگر زیستی مناسبی جهت بررسی‌های تاکسونومیکی و تبارزایی گونه‌های سودوموناس می‌باشد (مولت و همکاران ۲۰۱۰). پارکینسون و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از تعیین ترادف ژن *rpoD* در میان جدایه‌های تیپ *P. syringae* این ژن را به عنوان ابزاری مناسب و کارآمد برای شناسایی و ردیابی آزمایشگاهی جدایه‌های *P. syringae* معرفی کردند. جدایه‌های رورست *Pss* جداسازی شده در پژوهش حاضر با داشتن تنوع ژنتیکی بالا بر پایه ژن حفاظت شده مولد هسته‌ی یخ *inaZ*، توانایی بالایی در تشکیل هسته‌ی یخ در آزمایشگاه نشان دادند. اندرسون و همکاران (۱۹۸۴) بیان کردند که جمعیت فاز رورستی جدایه‌های *Pss* با رشد

منابع مورد استفاده

- احمدی ک، قلی‌زاده ح، عبادزاده ح، حاتمی ف، حسین‌پور ر، کاظمی‌فرد ر، و عبدشاه ه، ۱۳۹۵. آمارنامه کشاورزی. جلد سوم: محصولات باغی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصاد، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. تهران، ایران، ۲۴۰ صفحه.
- بهار م، مجتهدی ح، و اخیانی الف، ۱۳۶۱. شانکر باکتریایی درختان زردآلو در اصفهان. بیماری‌های گیاهی، ۱۸: ۶۸-۵۸.
- حسن‌زاده ن، ۱۳۹۱. اصول و روش‌های باکتری‌شناسی گیاهی. معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی. ۶۴۱ صفحه.
- خدایگان پ، صداقتی الف، حسینی‌پور الف، و بقایی‌راوری س، ۱۳۹۱. بررسی بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار و اثر ضدباکتریایی برخی از اسانس‌های گیاهی بر باکتری عامل آن در استان کرمان. بیماری‌های گیاهی، ۴۸: ۳۱۷-۳۰۳.
- دهقان-نیری م، رحیمیان ح و بابایی‌زاد و، ۱۳۹۵. شناسایی مخمر *Cryptococcus magnus* به عنوان عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار در برخی استان‌های مرکزی ایران. آفات و بیماری‌های گیاهی. ۸۴: ۲۵۰-۲۳۹.
- شمس‌بخش ا، و رحیمیان ح، ۱۳۷۶. مطالعه مقایسه‌ای عوامل مولد بلاست مرکبات و شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در مازندران. مجله بیماری‌های گیاهی، ۳۳: ۲۱۵-۲۰۹.
- عباسی و، رحیمیان ح، و تاجیک قنبری م ع، ۱۳۹۲. شناسایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در چند استان شمالی و مرکزی ایران. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۰: ۴۸-۲۷.

- عبداللهی ز، ۱۳۹۴. ردیابی عوامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار در شهرستان میانه و بررسی اثر ضدباکتریایی برخی مواد شیمیایی و اسانس ها و عصاره های گیاهی بر روی آنها در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.
- طاهری الف، طریقی س و طاهری پ، ۱۳۹۴. شناسایی و تخمین جمعیت باکتری های مولد هسته یخ جداسازی شده از درختان میوه هسته دار در استان خراسان رضوی. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی). ۲۹: ۴۴۹-۴۵۸.
- محمودی ه، رهنما ک، رحیمیان ح الف، نصراله نژاد ح و تقی نصب م، ۱۳۹۰. بررسی عوامل مولد و همراه شانکر و لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته دار در استان گلستان. مجله پژوهش های تولید گیاهی. ۱۸: ۱-۱۴.
- Abbasi V, Rahimian H and Tajick-Ghanbari MA, 2013. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal of Plant Pathology* 135: 225-235.
- Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. Pp. 949. Fifth edition, Elsevier Academic Press.
- Aiello D, Ferrante P, Vitale A, Polizzi G, Scortichini M and Cirvilleri G. 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicil and occurrence of copper-resistant strains. *Journal of Plant Pathology* 97: 273-282.
- Akaike H, 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716-723.
- Anderson JA, Buchanan DW and Stall RE, 1984. Reduction of bacterially induced frost damage to tender plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 401-405.
- Berge O, Monteil CL, Bartoli C, Chandeysson C, Guilbaud C, Sands DC and Morris CE, 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE* 9: e105547.
- Borhani B and Rahimian H, 2016. *Cryptococcus adeliensis* inciting branch canker on stone fruit trees. *European Journal of Plant Pathology* 145: 71-80.
- Bradbury JF, 1986. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Pp. 175-177 In *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*; CAB International Mycological Institute: Kew, England.
- Constantinidou HA, Menkissoglu O and Stergiadou HC, 1991. The role of ice nucleation active bacteria in supercooling of citrus tissue. *Plant Physiology* 81: 548-554.
- Doyle JJ and Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dye DW, 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. The carotovora groups. *New Zealand Journal of Science* 12: 81-97.
- Edgar RC, 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Edwards AR, Van Den Bussche RA, Wichman HA and Orser CS, 1994. Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. *Molecular Biology and Evolution* 11: 911-920.
- Fahy PC and Parsley GJ, 1983. *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide*. Pp. 393. Academic Press. Sydney, Australia.,
- Fujita M, Hanaura Y and Amemura A, 1995. Analysis of the *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. *Gene* 167: 93-98.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F and Grimont PAD, 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas*

- cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). International journal Journal of systematic Systematic bacteriology Bacteriology 49: 469–478.
- Green RL and Warren GJ, 1985. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. Nature 317: 645-648.
- Hwang MSH, Morgan RL, Sarkar SF, Wang PW and Guttman DS, 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Applied and Environmental Microbiology 71: 5182–5191.
- Jones JB, Chase AR and Harris GK, 1993. Evaluation of the Biology GN Microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. Plant Disease 77: 553–558.
- Jung HC, Lebeault JM and Pan JG, 1998. Surface display of Zymomonas mobilis levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. Nature Biotechnology 16: 576–580.
- Kennelly MM, Cazorla FM, De Vicente A, Ramos C and Sundin GW, 2007. *Pseudomonas syringae* disease of fruit, progress toward understanding and control. Plant Disease 91: 4-17.
- Kerstens K, De-Ley J, Sneath PHA and Sackin M, 1973. Numerical taxonomic analysis of Agrobacterium. Journal of General Microbiology 78: 227-239.
- Klement Z, Frakes GL and 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, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. Journal of Applied Bacteriology 29: 47-489
- Lindow SE, 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annual Review of Phytopathology 21: 363-384.
- Lindow SE, and Connell JH, 1984. Reduction of frost injury to almond by control of ice nucleation active bacteria. Journal of the American Society for Horticultural Science 109: 48-53.
- Lonetto M, Gribskov M and Gross CA, 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. Journal of Bacteriology 174: 3843-3849.
- Lorv JSH, Rose DR and Glick BR, 2014. Bacterial ice crystal controlling proteins. Scientifica 2014: 1-20.
- Mulet M, Lalucat J and García-Valdés E, 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology 12: 1513–1530.
- Natalini E, Rossi MP, Barionovi D and Scortichini M, 2006. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. Journal of Plant Pathology 88: 219-223.
- Nylander JAA, 2004. MrModeltest v2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Palleroni NJ, 1984. Genus I. *Pseudomonas* (Migula 1984). Pp. 141-199. In: Holt J G and Kreig N R (eds.), Bergey, S Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
- Parkinson N, Bryant R, Bew J and Elphinstone J, 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. Plant Pathology 60: 338–344.
- Pattnaik P, Batish VK, Grover S and Ahmed N, 1997. Bacterial ice nucleation: prospects and perspectives. Current Science 72: 316-320.

- Prunier JP and Bordjiba O, 1991. Effect of frost on bacterial necrosis of apricot buds. *Acta Horticulture* 293: 493-502.
- 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 Interactions* 7: 78-90.
- Ravindran A, Jalan N, Yuan JS, Wang N and Gross DC, 2015. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains B301D and HS191 and insights into intrapathovar traits associated with plant pathogenesis. *MicrobiologyOpen* 4:553–573.
- Rezaei R and Taghavi SM, 2014. Host specificity, pathogenicity and the presence of virulence genes in Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from different hosts. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47: 2377-2391.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sarkar SF and Guttman DS, 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1999–2012.
- Schaad NW, Jones JB and Chun W, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Pp. 373. Third edition. American Phytopathology Society.
- Schmid D, Pridmore D, Capitani G, Battistutta R, Neeser JR and Jann A, 1997. Molecular organization of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters* 414: 590-594.
- Sorensen K, Kim KH and Takemoto JY, 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strain. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 226-230.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- 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.
- Weisburg W, Barns S, Pelletier D and Lane D, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Xu GW and Gross DC, 1988. Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* defective in syringomycin production. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1345–1353.
- Yamamoto S, Ksai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A and Harayama S, 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146: 2385–2394
- Young JM, 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement), S1.5-S1.14.
- Zhang JH, Quigley NB and Gross DC, 1995. Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *Journal of Bacteriology* 177: 4009–4020.

Phenotypic Characterization and Grouping of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains, the Causal Agent of Apricot Canker in East Azerbaijan Province Based on Ice Nucleation Activity

Y Vasebi¹, R Khakvar^{2*}, B A Vinatzer³, M M Faghihi⁴ and A Saberivand⁵

¹PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³Professor, School of Plant and Environmental Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, USA.

⁴Assistant Professor, Department of Plant Protection Research, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

⁵Division of Theriogenology, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author: khakvar@tabrizu.ac.ir.

Received: 14 September 2018

Accepted: 22 December 2018

Abstract

Bacterial canker disease of stone fruit trees is one of the most important diseases in the world. In recent years, increasing of stone fruits canker disease symptoms as well as oozing and blast has been observed in some area in East Azerbaijan province of Iran. Fluorescent *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) strains were isolated from apricot trees which showed infected bud, bloom, branch and stem. The isolated strains were characterized based on their morphological, physiological and biochemical properties especially LOPAT and GATTa tests. Host preference was not observed among the tested strains and they showed pathogenicity on apricot green-cut twigs and green bean pods with different disease severity. A 725-bp fragment of the *syrB* gene which is required for synthesis of syringomycin was amplified using specific primers in all strains. The tested strains inhibited the *Geotrichum candidum* mycelial growth with significant differences by toxin production. Using specific designed INAF/INAR primers, the *inaZ* gene was partially amplified and different range of ice nucleation activity was detected in all *Pss* strains. Constructing dendrograms using Bayesian inference showed genetic diversity among strains based on partial sequencing of 16S rRNA, *rpoD* and *inaZ* genes. These results showed that there are diversity among the causal agent strains of apricot canker disease based on both pathogenicity, toxin production and ice nucleation activity phenotypes and genetics.

Keywords: Diversity, *inaZ*, Pathogenicity, *rpoD*.