# بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، جداشده ازدرختان میوه هسته‌دار، با استفاده از روش RFLP در استان کهگیلویه و بویر احمد

سامان جوزاریان[۱]، گیلدا نجفی پور*[۲] ، کاوس ایازپور[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۸، ش.ص ۱۶-۱، تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۲/۲۵)

## چکیده

شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ناشی از *Pseudomonas syringae pv. Syringae (Pss)*، در کلیه مناطق کشت درختان میوه هسته‌دار وجود دارد و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار در ایران است. این بیماری باعث ایجاد زوال در درختان جوان و کاهش محصول در درختان مسن می‌شود (Agrios, 2005). طی بازدیدهای انجام شده از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد، نمونه‌های آلوده به شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار جمع‌آوری شد. همه سویه‌ها به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی، ژنوتیپی، فیزیولوژیکی، بیماریزایی، تغذیه‌ای و وجود ژن *SyrB* مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این سویه‌های مورد نظر از لحاظ ژنوتیپی با روش RFLP نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. ویژگی‌های ریخت شناسی و زیست شناسی بررسی شده نشان داد که تمام سویه‌ها میله‌ای شکل،گرم منفی، متحرک، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت و از نظر واکنش فوق حساسیت روی توتون نیز مثبت هستند. کل سویه‌ها روی محیط کشت Kings´B تولید رنگ سبز فسفری نمودند. در آزمون‌های گروه LOPAT[3] نتیجه‌ی واکنش‌های اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی و آرژنین دهیدرولاز برای کلیه سویه‌ها منفی، اما نتیجه آزمون‌های لوان و فوق حساسیت مثبت ارزیابی شد. برای آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی از نرم افزار Ntsys-pc استفاده شد. نتایج نشان داد که سویه‌های مورد بررسی در سطح بالاتر از ۹۰٪ با هم تشابه دارند. تمام سویه‌ها در آزمون اثبات بیماریزایی، روی گیاهان هسته‌دار، در مدتی کمتر از دو هفته علایم بیماری را نشان دادند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B1 و B2، یک قطعه DNA به اندازه تقریبی ۷۵۲ جفت بازی تولید شد که این نتایج تشخیص پاتوار *Pss* را قطعی نمود. به منظور ارزیابی اثر انگشت ژنتیکی سویه‌ها از آزمون RFLP و آنزیم‌های kpnI، EcorI، HaeIII، AluI و HindIII استفاده شد که در این میان، تنها HaeIII قادر به ایجاد برش در ژن *SyrB* بود. اثر انگشت ژنتیکی حاصل از این برش در کلیه سویه‌ها یکسان ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون های فنوتیپی، بیماریزایی و RFLP نشان دادکه احتمالا سویه‌های *Pss* هسته داران در استان کهگیلویه و بویراحمد از یکنواختی زیادی برخوردارند.

**واژه‌های کلیدی**: درختان میوه هسته دار، ژن*SyrB*، PCR، *Pseudomonas syringae pv. syringae*، RFLP.

[۱]- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی
[۲] - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گیاهپزشکی، جهرم، ایران
*- نویسنده مسئول مقاله: gildanajafipour@gmail.com

[3] -Levan, Oxidase, Potato rot, Arginin dehydrolase and Tobacco hypersensitive (LOPAT)

## مقدمه

شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ناشی از *Pseudomonas syringae pv. syringae (Pss)* ، در کلیه مناطق کشت درختان میوه هسته‌دار وجود دارد؛ این بیماری تحت نام‌های بلاست جوانه، بلاست شکوفه، سرخشکیدگی و بلایت سرشاخه هم شناخته شده و یکی از مهم ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار در ایران است. این بیماری باعث ایجاد زوال در درختان جوان و کاهش محصول در درختان مسن می‌شود (Agrios, 2005). علائم بیماری غالبا به‌صورت خشکیدگی سرشاخه‌ها، ایجاد زخم و تراوش صمغ از محل آلودگی، ایجاد لکه یا زخم‌های ریز و برجسته قهو ای رنگ روی پوست میوه، سوراخ شدن پهنک برگ و در نهایت خشک شدن شاخه‌های اصلی و مرگ درخت می‌گردد (Najafi Pour and Taghavi, 2011).

باکتری مولد شانکر هسته‌داران، *Pss*، توانایی ایجاد بیماری در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی را دارد (Liu et al, 1999). به طوری که اعضای خانواده‌های Poaceae، Fabaceae، Oleaceae، Rosaceae و Rutaceae به عنوان میزبان آن گزارش شده‌اند ( Hirano and Upper, 1990). *Pss* علاوه بر شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، عامل بیماری‌های مهم دیگری همچون لکه قهوه‌ای لوبیا، بلاست مرکبات، لکه باکتریایی سورگوم و نوار قرمز نیشکر نیز می‌باشد ( Rahimian, 1995; Hirano et al, 1995 ; Groos and Devay, 1997). برخی بررسی‌ها نشان داده که سویه‌های *Pss* گندم، سورگوم، درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار از لحاظ سرولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماریزایی متفاوتند (Fryda and Otta., 1978). به نظر می‌رسد پاتووارهای *Pss* نسبت به میزبان‌های خود اختصاصی عمل می‌کنند (Hirano and Upper., 1990 )؛ به طوری که *Pss* جدا شده از لوبیا، ایجاد واکنش بیماری‌زایی روی لوبیا می‌کند؛ در حالی که سویه‌های *Pss* متعلق به سایر میزبان‌ها، واکنش غیر بیماری‌زایی روی لوبیا تولید می‌نمایند (Little et al., 1998 ). گرت و همکاران در مطالعه‌ای سودوموناس‌های بیماری‌زای درختان هسته‌دار و گلابی را مورد مقایسه قرار دادند که در این تحقیق اختلاف منطقی و ثابتی بین سویه‌های درختان هسته‌دار و گلابی پیدا نکردند (Garrett et.al, 1966)؛ با این همه در آزمایشات رز و هاتینگ (۱۹۸۷)، مقایسه سودوموناس‌های بیماری‌زای درختان میوه هسته‌دار و سویه‌هایی از درختان گلابی اختلاف‌هایی را بین سویه‌های *Pss* درختان هسته‌دار و گلابی نشان داد (Hattingh et al., 1989). علاوه بر این مطالعات گاردان و همکاران نشان دهنده تنوع زیاد بین سویه‌های *Pss* و قرار گرفتن آنها در گروه‌های جداگانه می‌باشد (Gardan et al., 1990). از طرفی، برخی مطالعات دیگر، نشان دهنده‌ی تنوع ژنتیکی در میان سویه‌های این باکتری که از میزبان‌های مختلف جدا شده‌اند، می‌باشد (Najafi Pour et al., 2014). مطالعات عباسی و همکاران هم به وجود این تنوع اشاره دارد (Abbasi et al., 2013). به عقیده یانگ گرچه *Pss* برخلاف سایر پاتووارهای *Pseudomonas syringae* از لحاظ بیماری‌زایی، میزبان‌های متنوعی دارد، اما در زمینه‌ی گستردگی حقیقی دامنه‌ی میزبانی آن، تردیدهای فراوانی وجود دارد (Young, 1991). به‌علاوه وی عنوان نمود که بسیاری از سویه‌های منتسب به *Pss* که شباهت کمی با *Pss* دارند، می‌توانند به عنوان گونه‌ی جدید شناسایی و طبقه‌بندی شوند (Young, 1991).

در ایران، *Pss* به‌عنوان عامل بیماری شانکر باکتریایی زردآلو، توسط بهار و همکاران در اصفهان گزارش گردید ( Bahar et al., 1983). در مازندران نیز، از عامل شانکر باکتریایی درختان هسته‌دار به عنوان *Pss* یاد شده است (Mosivand et al., 2009). همچنین ابراهیم زاده و همکاران، *Pss* را به عنوان مهمترین عامل سرخشکیدگی باکتریایی درختان زردآلو در باغ‌های شهرستان مرند معرفی کرده‌اند (Ebrahimzade et al., 2008). علاوه بر این باکتری مذکور از استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و اصفهان (Najafi Pour and Taghavi., 2011؛ Erfani Nik et al., 2017 2017 )، آذربایجان شرقی ( Iragi and Rahnama, 2018)، اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی (Abbasi et al., 2012) و خراسان رضوی و شمالی ( Ahsani et al., 2018) نیز گزارش شده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده و وجود ابهامات در رابطه با طبقه بندی سویه‌های *Pss* بر اساس خصوصیات ژنوتیپی به نظر می‌رسد به تحقیقات بیشتری در این زمینه در کشور نیاز است. با توجه به موارد ذکر شده، هدف پژوهش حاضر، بررسی و مقایسه سویه‌های *Pss* جداشده از درختان میوه هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویر احمد، از لحاظ فنوتیپ، ژنوتیپ و بیماری‌زایی می‌باشد.

## نمونه برداری وجداسازی

طی بازدیدهایی که در فصول زمستان و بهار، از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد (شامل یاسوج، گنجگون، سپیدار، کاکان، کوه گل، کریک، مارگون، دهدشت، دشت روم، الله آباد، تنگ خشک، پریکدان، سی سخت، امیرآباد سی سخت، دهنو سی سخت، وزگ، تنگ سرخ، قلات و تل خسرو)، از شاخه، برگ و تنه‌ی درختان هسته‌دار آلوده به شانکر باکتریایی نمونه برداری و با ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شد.

جهت جداسازی از شاخه‌های آلوده به صورت زیر عمل شد: ابتدا بافت‌های مورد نظر با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده، قطعاتی به ابعاد ۰/۵ سانتی متر، از حاشیه شانکرها و بافت قهوه‌ای برش داده شده و سپس با آب مقطرسترون شستشو شدند. پس از گذشت سه ساعت، یک لوپ از سوسپانسیون حاصله روی محیط‌های آگار مغذی (NA) و کینگ B (King's B) به صورت خطی کشت داده شد. پتری‌ها به مدت ۳-۲ روز در دمای ۲۷ $^{o}C$ نگهداری شده و پرگنه‌های تولید کننده لوان و فلورسنت روی محیط KB انتخاب و خالص سازی شدند.

در جداسازی از برگ‌های آلوده، ابتدا برگ‌های دارای علائم، با آب روان شسته شده، سپس قطعاتی از حد فاصل بافت سالم و آلوده جدا و در شرایط سترون در هاون حاوی آب مقطر سترون عصاره‌گیری شد. سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت آگار غذایی و کینگ B به صورت خطی کشت شد. پتری‌های کشت شده به مدت ۳-۲ روز در دما ۲۷ $^{o}C$ نگهداری شده و پرگنه‌های فلورسنت در محیط KB، خالص سازی شدند. پس از آن، یک پرگنه خالص از هر سویه به لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر سترون منتقل و جهت مطالعات تکمیلی در دمای ۴ $^{o}C$ نگهداری شد(Schaad et al., 2001).

## بررسی خصوصیات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیماریزایی

سی سویه جمع آوری شده که به‌طور اولیه به عنوان *Pss* تلقی شده بودند، به عنوان نماینده، انتخاب و آزمون‌های بیوشیمیایی روی آنها انجام گرفت. این آزمون‌ها شامل: واکنش گرم، رشد هوازی و بی هوازی، کاتالاز، آزمون‌های LOPAT (لوان، اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی، آرژنین و فوق حساسیت روی توتون)، آزمون‌های GATTa ( تجزیه ژلاتین، هیدرولیز آسکولین، تیروزیناز و تارتارات)، استفاده از قندها، بیماری‌زایی روی هلو و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی بود ( Schaad et al., 2001; Fahy & Persly, 1983).

در آزمون بیماری‌زایی، سه سویه *Pss* از هر میزبان به عنوان نماینده، انتخاب و روی گیاهان مختلف مانند نهال‌های هلو، بادام، زرد آلو، بادام، گیلاس و آلو مایه زنی گردید. جهت مایه‌زنی روی نهال‌های درختان مختلف هسته‌دار از کشت ۴۸ ساعته‌ی جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی(NA)، سوسپانسیونی به غلظت ۱۰^۸cfu/ ml ($OD_{600}$=1) در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس سوسپانسیون حاصله از طریق محل افتادن برگ‌ها و زخم مصنوعی ایجاد شده در شاخه‌های جوان، به نهال‌های هلو، بادام، زرد آلو، گیلاس و آلو تزریق شد. برای حفظ رطوبت، محل مایه زنی به مدت دو روز با پارافیلم پوشانده شد. در تیمارهای شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر سترون به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Kałużna & Sobiczewski, 2009). ظهور علائم و نحوه‌ی پیشرفت بیماری، حداکثر تا دو ماه مورد بررسی قرار گرفت. بروز هر یک از علائم شانکر، ترشح صمغ و قهوه‌ای شدن زیر پوست، با هم یا به تنهایی به عنوان واکنش مثبت تلقی گردید (Lelliott and Stead, 1987).

## بررسی خصوصیات ژنوتیپی سویه‌ها

### آماده سازی نمونه‌ها

به این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی به غلظت ۱۰^۸ cfu/ml ($OD_{600}$=1) تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری و بلافاصله یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن سوسپانسیون حاصله به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰سانتریفیوژ شده و از فاز رویی آن مستقیما جهت انجام PCR استفاده گردید (Yaish, 2006).

## استفاده از آغازگرهای اختصاصی جهت ردیابی پاتوارهای *Pss*

به این منظور از آغازگر اختصاصی *syr* B (Sorensen et al., 1998) با ترادف‌های زیر استفاده شد (Cinagen, Iran).

primer B1 5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'

Primer B2 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'

واکنش PCR نیز توسط ترموسایکلر بیوتک (Quanta bioteck, USA) انجام شد. مواد مورد نیاز (محصول شرکت سیناژن ایران) و چرخه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است.

**جدول ۱- مواد لازم جهت انجام واکنش PCR به منظور تشخیص پاتوارهای *Pss***

| مقدار ماده مصرفی در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری | غلظت نهایی | نوع ماده مصرفی |
|---|---|---|
| ۱۲/۵ میکرولیتر | ۱ x | Master Mix |
| ۱/۵ میکرولیتر | ۰/۱ -۱ µM | آغازگر Forward |
| ۱/۵ میکرولیتر | ۰/۱ -۱ µM | آغازگرReverse |
| ۲/۵ میکرولیتر | ۱۰ pg -۱ µg | سوسپانسیون جوشانده باکتری |
| ۷ میکرولیتر | - | آب دیونیزه سترون |

**جدول ۲- چرخه دمایی استفاده شده در واکنش PCR جهت تشخیص پاتوارهای *Pss***

| مرحله | دما($^{o}$C) | زمان | تعداد چرخه |
|---|---|---|---|
| واسرشته شدن | ۹۵ | ۳۰ s | |
| جفت شدن آغازگرها | ۵۶ | ۳۰ s | ۲۸ |
| امتداد | ۷۰ | ۶۰ s | |

## آزمون RFLP

جهت انجام این آزمون، محصول PCR تشخیصی (ژن *syrB* ) تحت تاثیر آنزیم‌های HaeIII، EcoRI، KpnI، AluI، HindIII قرار گرفت. میزان مواد استفاده شده در واکنش (Fermentase, Germany and Cinagen, Iran) در جدول ۳ آمده است. هضم محصول PCR در دمای $^{o}$C ۳۷ و به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس، نمونه‌ها الکتروفورز شده و باندهای تشکیل شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت آنالیز نتایج از نرم افزار Ntsys-pc استفاده و دندوگرام مربوطه ترسیم شد (Rohlf, 2000).

**جدول ۳- نوع و مقدار مواد استفاده شده در هر واکنش RFLP**

| مقدار ماده مصرفی در یک واکنش ۲۵ میکرولیتر | نوع ماده مصرفی |
|---|---|
| ۱۲ میکرولیتر | آب دیونیزه سترون |
| ۲ میکرولیتر | ۱۰x fast Digest buffer |
| ۱۰ میکرولیتر | محصول PCR |
| ۱ میکرولیتر | Fast Digest enzyme |

### تجزیه و تحلیل داده های فنوتیپی و ژنوتیپی

ابتدا با استفاده از نرم افزارTotal lab V. 1.10 باندهای روی ژل شناسایی شده و پس از آن با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و فاصله ژنتیکی سویه‌ها ترسیم گردید (Rohlf, 2000). شباهت ژنتیکی بین سویه‌ها بر اساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم وجود باند در ژل تعیین شد، به طوری که برای وجود و عدم وجود باند به‌ترتیب کد یک و صفر در نظر گرفته شد. در بررسی خصوصیات فنوتیپی نیز برای واکنش منفی و مثبت آزمون، به ترتیب کدهای صفر و یک در نظر گرفته شد. نرم افزار Ntsys-pc توانایی تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم دندوگرام را داراست. درصد تشابه بین سویه‌های موجود بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی به‌طور جداگانه با نرم افزار مذکور محاسبه گردید (Rohlf, 2000).

## نتایج

### نمونه برداری، جداسازی و تعیین خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ها

طی فصول زمستان و بهار، بازدیدهایی از باغ‌های درختان میوه هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد، صورت گرفته و نمونه‌های مشکوک به آلودگی با شانکر باکتریایی هسته‌داران جمع آوری شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی به همراه مشخصات محل جمع آوری، نوع میزبان و زمان جمع آوری به آزمایشگاه انتقال داده شدند (جدول ۱). در شرایط سترون نمونه‌ها جداسازی و کشت اولیه در محیط NA انجام شد. سپس تک پرگنه‌های سفید وکرم خالص شده و به منظور بررسی‌های بعدی نگهداری شدند (جدول ۴). در مجموع، سی سویه که از لحاظ واکنش گرم، اکسیداز، آرژنین و لهیدگی سیب زمینی منفی بوده اما واکنش فوق حساسیت و لوان آنها مثبت بود، به صورت مقدماتی به عنوان *Pss* در نظر گرفته شده و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام شد. کلیه سویه‌ها در آزمون کاتالاز، فسفاتاز، تولید قلیا از شیر لیتموس و تولید رنگدانه فلورسنت واکنش مثبت نشان دادند. به علاوه کلیه سویه‌ها در شرایط هوازی از سیترات و گلوکز استفاده نموده ولی آزمون استوئین، احیای نیترات، رشد در$41^{o}C$، هیدرولیز نشاسته و متیل رد در تمام موارد منفی ارزیابی شد. در آزمون GATTa ( هیدرولیز ژلاتین، آسکولین، تیروزیناز و تارتارات) کلیه سویه‌ها در آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین و آسکولین، واکنش مثبت و در آزمون تیروزیناز و تارتارات دارای واکنش منفی بودند. در تولید اسید از کربوهیدرات‌ها هیچ سویه‌ای نتوانست از لاکتوز، رافی نوز، مالتوز، رامنوز و تری هالوز استفاده نماید، درمقابل کلیه سویه‌ها از سوکروز، مانوز، زایلوز، گالاکتوز، فروکتوز، آرابینوز، دکستروز وگلوکز استفاده کردند. در آزمون تولید اسید از الکل‌ها کلیه سویه‌ها از مانیتول، سوربیتول، اریتریتول ، آرابینوز، گلیسرول و اینوزیتول استفاده کردند، در صورتی که هیچ سویه‌ای توانایی استفاده از آدونیتول و دالسیتول را نداشت. به علاوه هیچ یک از سویه‌ها قادر به استفاده از ال تارتارات، متیونین، اینولین و سالیسین نبودند. سایر نتایج در جداول ۵ و ۶ ثبت شده است.

### آزمون بیماریزایی

از سویه‌های *Pss* هلو، گیلاس، بادام، زردآلو و آلو، نماینده‌ای انتخاب و بیماری‌زایی آنها مورد بررسی قرار گرفت. ظاهر شدن هر یک از علائم شانکر، ترشح صمغ و قهوه‌ای شدن زیر پوست، با هم یا به تنهایی به عنوان واکنش مثبت تلقی شد. در این میان بدون در نظر گرفتن تخصص میزبانی، کلیه سویه‌ها روی هلو به عنوان حساس‌ترین میزبان در کمتر از یک هفته واکنش مثبت نشان داد. اغلب سویه‌ها با گذشت زمان توانایی ایجاد شانکر و ترشح صمغ را داشتند، به طوری که ناحیه زیرین شانکرها در اثر فعالیت باکتری قهوه‌ای شده بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). نتایج به دست آمده در جدول ۷ ثبت شده است.

**جدول ۴- مشخصات سویه‌های *Pseudomonas syringae pv. syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد**

| کد سویه | میزبان | محل نمونه برداری | کد سویه | میزبان | محل نمونه برداری |
|---|---|---|---|---|---|
| S5 | بادام | سی سخت | K2 | گیلاس | کریک |
| gn1 | هلو | گنجگون | M15 | هلو | مارگون |
| y7 | آلوسیاه | یاسوج | D6 | بادام | دهدشت |
| Sp9 | هلو | سپیدار | S16 | هلو | سی سخت |
| K12 | هلو | کاکان | Da11 | زردآلو | دشت روم |
| W20 | بادام | وزگ | y3 | آلو | یاسوج |
| Kg4 | بادام وحشی | کوه گل | A1 | بادام | الله آباد |
| T6 | گیلاس | تلخسرو | Ts18 | هلو | تنگ سرخ |
| K40 | زردآلو | کاکان | y9 | هلو | یاسوج |
| Ts9 | هلو | تنگ سرخ | y17 | البالو | یاسوج |
| W13 | بادام | وزگ | Gn4 | هلو | گنجگون |
| S9 | بادام | سی سخت | Tk8 | هلو | تنگ خشک |
| g12 | بادام | قلات | P14 | هلو | پریکدان |
| Tk1 | بادام | تنگ خشک | g25 | آلو سرخ | قلات |
| Kg16 | بادام وحشی | کوه گل | Tk1 | بادام | تنگ خشک |
| g5 | زردآلو | قلات | g12 | بادام | قلات |
| *Pss* | سویه استاندارد | اهدایی مرکز تحقیقات یاسوج | *Psm* | گیلاس | یاسوج |

**جدول ۵- مشخصات فنوتیپی *Pseudomonas syringae pv syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد**

| نام آزمون | واکنش | نام آزمون | واکنش |
|---|---|---|---|
| رنگ آمیزی گرم | - | لسیتیناز | - |
| واکنش پتاس ۳٪ | - | اثر روی شیر لیتموس | + |
| تولید لوان | + | لهانیدن سیب زمینی | - |
| اکسیداز | - | فوق حساسیت در شمعدانی | + |
| کاتالاز | + | اوره آز | + |
| رشد هوازی و بی هوازی | هوازی | هیدرولیز آرژنین | - |
| اوره آز | + | هیدرولیز ژلاتین | + |
| هیدرولیز آرژنین | - | هیدرولیز آسکولین | + |
| هیدرولیز ژلاتین | + | هیدرولیز نشاسته | - |
| هیدرولیز آسکولین | + | تولید مواد احیا کننده از ساکارز | - |
| هیدرولیز نشاسته | - | تولید ایندول | - |
| تیروزیناز | - | تولید استویین | - |
| لیپاز(توویین ۸۰) | + | رشد در $41^{o}C$ | - |
| هیدرولیز کازئین | + | احیای نیترات | - |
| فسفاتاز | + | مصرف تارتارات | - |
| مصرف سیترات | + | تولید $H_2S$ از پپتون | - |
| تحمل نمک طعام۵ ٪ | - | | |

**جدول۶- مشخصات تغذیه‌ای (تولید اسید از کربوهیدرات‌ها و الکل‌ها ) باکتری *Pseudomonas syringae pv. syringae* جدا شده از درختان میوه هست دار در مناطق مختلف استان کهکیلویه و بویراحمد**

| نام آزمون | نوع واکنش | نام آزمون | نوع واکنش | نام آزمون | نوع واکنش |
|---|---|---|---|---|---|
| سوکروز | + | آسپاراژین | + | تری هالوز | – |
| زایلوز | + | لاکتات | + | سلوبیوز | + |
| لاکتوز | – | دی تارتارات | + | آرابیتول | + |
| مانوز | + | ال تارتارات | – | مانیتول | + |
| رافینوز | – | اینولین | – | سوربیتول | + |
| آرابینوز | + | گالاکتوز | + | متیونین | – |
| رامنوز | – | فروکتوز | + | ملی بیوز | – |
| مالتوز | – | دکستروز | + | | |

**شکل ۱- ایجاد شانکر در نهال گیلاس، مایه زنی شده با سویه‌های *Pseudomonas syringae pv. syringae* جدا شده از آلو زرد**

**شکل ۲- ایجاد لکه‌های نکروتیک روی پوست گیاهچه هلو مایه زنی شده با *Pseudomonas syringae pv. syringae* جدا شده از بادام**

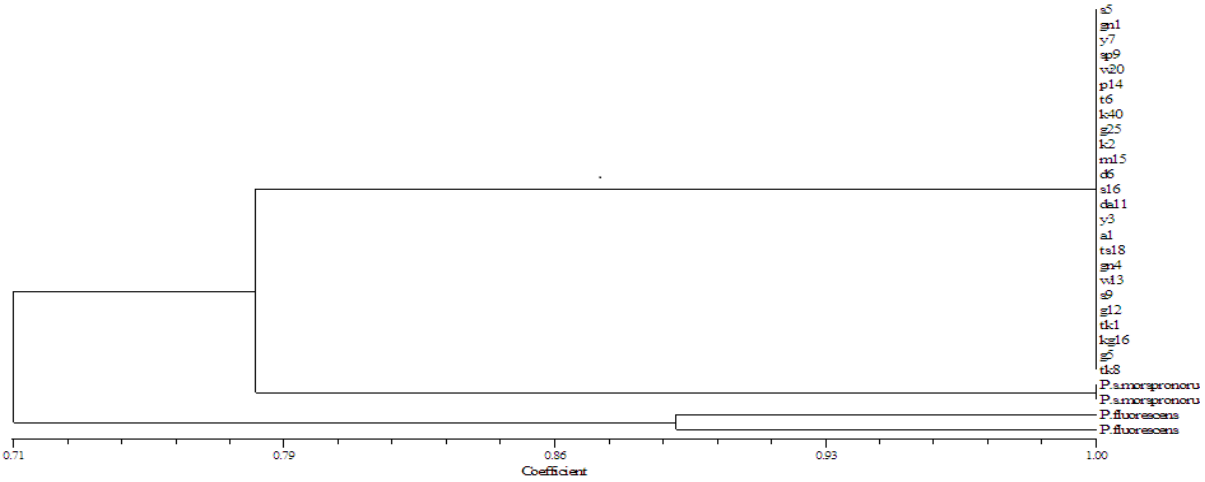
**شکل۳- قهوه‌ای شدن بافت در شاخه زردآلو در اثر مایه زنی با سویه *Pseudomonas syringae pv. syringae* جدا شده ازهلو**

**جدول ۷- نتایج آزمون بیماریزایی سویه‌های *Pseudomonas syringae pv. syringae* از میزبان‌های مختلف هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد**

| میزبان اصلی | نوع نهال مایه زنی شده | نتیجه | میزبان اصلی | نوع نهال مایه زنی شده | نتیجه |
|---|---|---|---|---|---|
| هلو | هلو | + | هلو | زردآلو | + |
| زردآلو | هلو | + | زردآلو | زردآلو | + |
| گیلاس | هلو | + | گیلاس | زردآلو | + |
| آلو | هلو | + | آلو | زردآلو | + |
| بادام | هلو | + | بادام | زردآلو | + |
| هلو | آلو | +ضعیف | هلو | گیلاس | + |
| زردآلو | آلو | +ضعیف | زردآلو | گیلاس | + |
| گیلاس | آلو | +ضعیف | گیلاس | گیلاس | + |
| آلو | آلو | + | آلو | گیلاس | + |
| بادام | آلو | +ضعیف | بادام | گیلاس | + |
| هلو | بادام | + | آلو | بادام | + |
| زردآلو | بادام | + | بادام | بادام | + |
| گیلاس | بادام | + | | | |

## تجزیه و تحلیل ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS

بر اساس آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی، با استفاده از نرم افزار NTsys-pc، ۳۰ سویه جداشده از هسته‌داران، با تشابه بالای ۹۰٪ در کنار هم قرار داشتند و در سطح تشابه ۷۱٪ و ۷۹ ٪ به ترتیب از P. fluorescens و P. s. pv. morspronorum جدا شدند. دندروگرام حاصله در شکل ۴ آمده است.

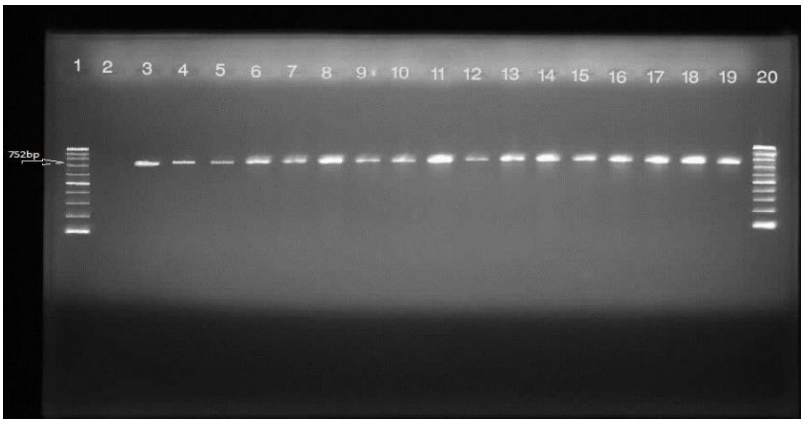



**شکل ۴- دندروگرام رسم شده بر اساس آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی سویه‌های *P. syringae pv. syringe* درختان میوه هسته‌دار با استفاده از نرم افزارNTsys-pc. مشخصات سویه‌ها در جدول ۱ آورده شده است**

## بررسی خصوصیات ژنوتیپی سویه‌ها

### ردیابی باکتری با آغازگر اختصاصی $B_1$ و $B_2$

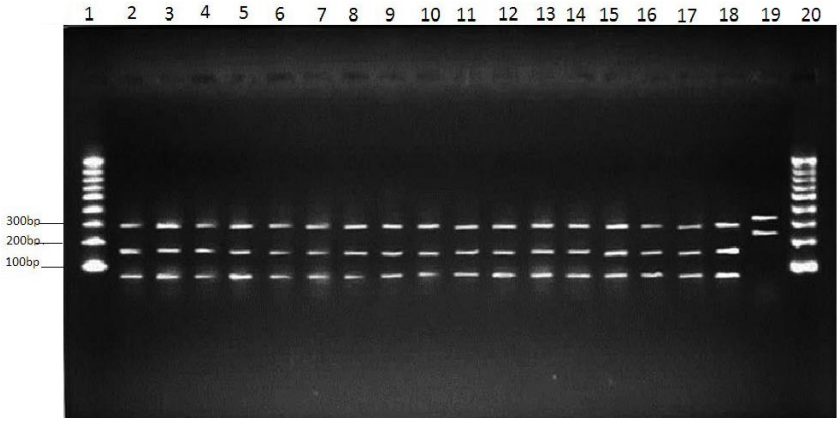
کلیه سویه‌های بدست آمده در این پژوهش که *Pss* بودن آنها با آزمون‌های بیوشیمیایی به اثبات رسیده بود به همراه سویه *Pss* اهدایی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کهگیلویه و بویر احمد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی $B_1$ و $B_2$ مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه سویه‌ها قادر به سنتز قطعه‌ای DNA با اندازه تقریبی ۷۵۲ جفت باز بودند، در حالی که *P. fluorescens* قادر به تکثیر چنین قطعه‌ای نبود (شکل ۵).




**شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای B1 و B2 در *P. syringae pv. syringae* ، ستون ۱– مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۲- کنترل منفی؛۳- سویه استاندارد *Pss* ؛ ۴- سویه هلو (gn1)؛ ۵- سویه گیلاس (T6)؛ ۶- سویه زردآلو (Da11)؛ ۷- سویه هلو (sp9)؛ ۸- سویه بادام (W20)؛ ۹- سویه زردآلو (g5)؛ ۱۰- سویه آلو سیاه (y7)؛ ۱۱- سویه آلو (y3)؛ ۱۲- سویه آلبالو (y17)؛ ۱۳- سویه هلو (k12)؛ ۱۴- سویه بادام وحشی (Kg4)؛ ۱۵- سویه هلو؛(y9)؛ ۱۶- سویه آلوسرخ (g25)؛ ۱۷- سویه استاندارد Pss؛ ۱۸- سویه زردآلو (K40)؛ ۱۹-سویه بادام (A1) و ۲۰– مارکر ۱۰۰ جفت بازی**

### آزمون RFLP

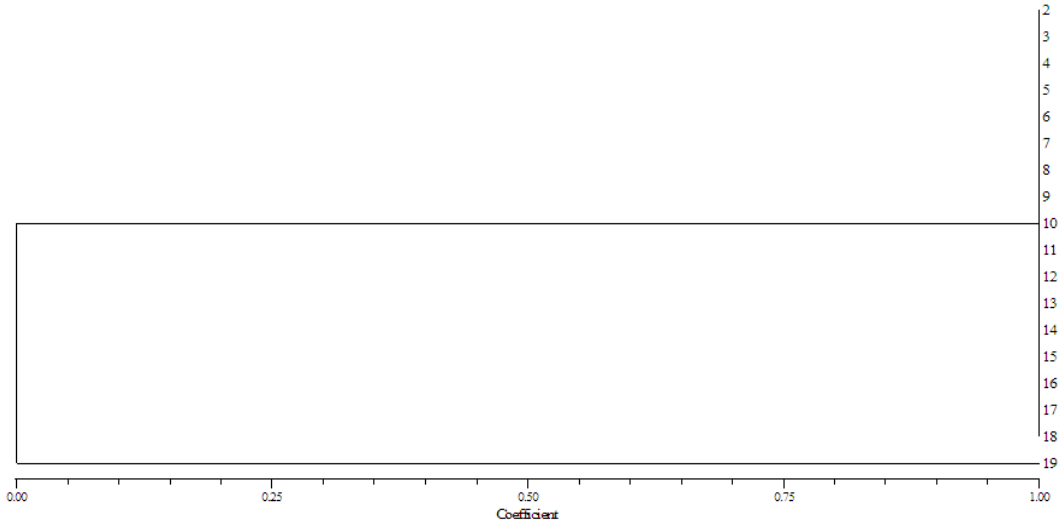
در این آزمون، DNA حاصله از PCR تشخیصی سویه‌های *Pss* تحت تأثیر آنزیم‌های HindIII، AluI، HaeIII، EcoRI، kpnI قرار گرفت. از این میان تنها برش با آنزیم HaeIII سه قطعه DNA ایجاد نمود که در تمام سویه‌های *Pss* مشترک بود (شکل۶). این در حالی بود که آنزیم مذکور روی *P. s. pv. morspronorum* تنها دو برش ایجاد نمود که از برش‌های ایجاد شده در ژن *syrB* مربوط به *Pss* متمایز بود. سایر آنزیم‌های مورد استفاده در این آزمون هیچ گونه برشی در ژنوم ایجاد نکردند.




**شکل ۶- انگشت نگاری ژنتیکی سویه های *Pss*، هضم شده با آنزیم HaeIII در آزمون RFLP: ۱- مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۲- سویه بادام؛ ۳- سویه هلو؛ ۴- سویه هلو ۵- سویه گیلاس؛ ۶- سویه زردآلو؛ ۷- سویه هلو ۸- سویه بادام ۹- سویه زردآلو؛ ۱۰- سویه آلوزرد؛ ۱۱- سویه گوجه سبز؛ ۱۲- سویه آلبالو؛ ۱۳- سویه هلو؛ ۱۴- سویه بادام وحشی؛ ۱۵- سویه هلو؛ ۱۶- سویه آلوسرخ؛ ۱۷- سویه هلو؛ ۱۸- سویه Pss استاندارد ؛ -۱۹سویه Psm گیلاس؛ ۲۰- مارکر ۱۰۰ جفت بازی**

### تجزیه و تحلیل خصوصیات ژنوتیپی سویه‌ها با نرم افزار NTSYS

در این آزمون، ۳۰ سویه‌ی *Pss* جداشده از درختان میوه هسته‌دار بدون اختلاف در کنار یکدیگر قرار گرفته و از سویه *Psm* جدا شدند (شکل ۷).




**شکل ۷- دندروگرام رسم شده بر اساس هضم آنزیمی با HaeIII در سویه‌های *Pss* با استفاده از نرم افزارNTsys-pc . مشخصات سویه‌ها در جدول ۱ آمده است**

## بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش درختان میوه هسته‌دار در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد که علائم شانکر باکتریایی هسته‌داران را نشان می‌دادند مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نمونه برداری و جداسازی باکتری از بافت‌های آلوده،۳۰ سویه گرم منفی با پرگنه‌های کرم مایل به زرد انتخاب شد و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام گرفت. کلیه سویه‌ها در آزمون LOPAT (لوان، اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی، آرژنین دهیدرولاز و فوق حساسیت روی توتون) دارای واکنش اکسیداز، آرژنین و لهیدگی سیب زمینی منفی بوده، اما واکنش فوق حساسیت و لوان در آنها مثبت بود. در آزمون‌های گروه GATTa (شامل آزمون هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز آسکولین، تیروزیناز و تارتارات) کلیه سویه‌ها در هیدرولیز ژلاتین و آسکولین دارای واکنش مثبت و در آزمون تیروزیناز و استفاده از تارتارات واکنش منفی نشان دادند. به علاوه هیچ یک از سویه‌ها توانایی استفاده از دی تارتارات را نداشته؛ در مقابل کلیه آنها قادر به استفاده از ال تارتارات بودند. تحقیقات مشابه نیز نشان می‌دهدکه سویه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار توانایی استفاده از ال تارتارات را داشته در صورتی که توانایی استفاده از دی تارتارات را ندارند ( Najafi Pour & Erfani Nik et al., 2017 ؛ Taghavi, 2011; Mohamadi et al., 2001; Najafi Pour and Hasani, 2014 ). هیچ یک از سویه‌ها توانایی استفاده از لاکتوز، رافینوز، مالتوز، رامنوز و تری هالوز را نداشتند. نتایج مذکور با یافته‌های الداغی و همکاران مطابقت دارد (Eldaghi et al., 2009 )؛ اما با نتایج موسیوند و همکاران مغایرت دارد. آنها بیان کردند که سویه‌های *Pss* توانایی استفاده از تری هالوز را دارند که با نتایج حاصل از این پژوهش مغایرت دارد (Mosivand et al., 2009). این مغایرت نتیجه‌ای دور از انتظار نیست و به علت جهش‌های ژنتیکی مختلف در ژنوم باکتری دیده می‌شود. با توجه به این نکته، تفاوت در خصوصیات فنوتیپی افراد یک گونه، حداکثر تا ۲۰٪ قابل پذیرش است (Swings & Hayward, 1990).

کلیه سویه‌ها توانایی تولید اسید از گالاکتوز، زایلوز، فروکتوز، مانوز، سوکروز، آرابینوز، گلوکز و دکستروز را دارا بودند. الداغی و همکاران نیز نشان دادند سویه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار از گلوکز، گالاکتوز، دی مانوز و سوکروز استفاده کردند ( Eldaghi et al., 2009). به علاوه بررسی‌های نصرالله نژاد و همکاران توانایی سویه‌های *Pss* جداشده از درختان میوه هسته‌دار در استفاده از فروکتوز و ساکارز را نشان داد (نصرالله نژاد و همکاران، ۱۳۸۶). سایر نتایج نیز نشان داده سویه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار از کربوهیدرات‌هایی همچون سوکروز، گلوکز، فروکتوز، زایلوز، گالاکتوز، مانوز و آرابینوز تولید اسید می‌نمایند که مطابق با نتایج این تحقیق است (Ahsani et al., 2018 ؛ Erfani Nik et al., 2017 ؛ Mosivand et al. 2009).

تمامی ۳۰ سویه‌ی مورد بررسی توانایی تولید اسید از الکل، مانیتول، سوربیتول، اریتریتول، آرابینوز، گلیسرول و اینوزیتول را دارا بودند؛ در حالی‌که توانایی استفاده از آدونیتول، دالسیتول، متیونین، اینولین و سالیسین را نداشتند که با نتایج سایر محققان تطابق دارد (Eldaghi et al., 2009).

در آزمون اثبات بیماری‌زایی از هر میزبان نماینده‌ای انتخاب و بیماری‌زایی آنها بر روی درختان میوه هسته‌دار بررسی گردید. کلیه سویه‌ها در هلو به عنوان حساس‌ترین میزبان قابلیت ایجاد علائمی همچون ایجاد شانکر، ترشح صمغ، وقهوه‌ای شدن بافت زیر پوست را داشتند. همچنین اغلب میزبان‌های بررسی شده با درجات متفاوتی علائم بیماری را نشان دادند. نتایج حاصله نشان داد که حداقل درون میزبان‌های هسته‌دار در استان هیچ گونه ترجیح میزبانی مشخصی دیده نمی‌شود، نتیجه اخیر با نتایج ضیایی و تقوی مشابه است. آنها بیماری‌زایی سویه‌های درختان میوه هسته‌دار را روی شاخه‌های هلو و زردآلو بررسی کردند و عنوان نمودند شانکر گسترده‌ای در میزبان‌های اخیر ایجاد می‌شود (Ziaee and Taghavi, 2003). در پژوهش الداغی و همکاران نیز تمامی سویه‌های درختان میوه هسته‌دار در آزمون بیماری‌زایی روی این گروه میزبانی بیماری‌زا بودند ( Eldaghi et al., 2009). نتایج بیماری‌زایی در این پژوهش با یافته‌های لیتل و همکاران نیز مطابقت دارد. آنها عنوان نمودند: ۸۹ سویه که از میزبان‌های مختلف جدا شده بودند صرف‌نظر از میزبان اولیه، قادر به ایجاد بیماری در نهال هلو بودند (Little et al., 1998). همچنین سیرویلری و همکاران عنوان نمودند تمام سویه‌های *Pss* که قابلیت تولید سیرینگومایسین را دارند قادر به ایجاد بیماری روی درختان میوه هسته‌دار هستند (Cirvilleri et al., 2005). علاوه بر این نتایج پژوهشگران دیگر نیز نشان داده که سویه‌های

*Pss* درختان میوه هسته‌دار، روی هلو و زردآلو بیماری‌زا هستند (Abbasi et al., 2012 ؛ Abbasi et al., 2013 ؛ Erfani Nik et al., 2017؛ Ahsani et al., 2018)، که همگی با نتایج این پژوهش منطبق است .

در بررسی‌های فنوتیپی حداقل میزان شباهت بین افراد یک گونه بالاتر از ۸۰٪ است (Swings & Hayward, 1990) و از آنجا که در این پژوهش سویه‌های یک پاتووار مورد استفاده قرارگرفتند بنابراین شباهت بالای آنها دور از انتظار نبود.

در آنالیز داده‌های فنوتیپی با نرم افزار Ntsys-pc، ۳۰ سویه که به عنوان *Pss* در نظر گرفته شده بودند، با تشابه بالای ۹۰٪ در کنار یکدیگر قرار گرفته و در سطح تشابه ۷۱٪ و ۷۹ ٪ به ترتیب از از *P.fluorescens* و *Pseudomonas syringae pv. morspronorum* جدا شدند. نتایج سایر محققین نیز نشان می‌دهد که سویه‌های *Pss* دارای خصوصیات فنوتیپی نسبتا" مشابهی هستند (Najafi Pour and Taghavi, 2011; Najafi Pour et al., 2015؛Hirano and Upper, 2000; Najafi Pour et al., 2014 ). نجفی پور و تقوی با بررسی خصوصیات فنوتیپی میزبان‌های مختلف با استفاده از نرم افزار Ntsys –pc عنوان نمودند سویه‌های *Pss* در سطح تشابه ۹۰٪ در کنار هم قرار گرفته و از گونه‌های *P.meliae* و *P. savastanoi pv savastanoi* به ترتیب در سطوح ۵۰٪ و ۶۳٪ جدا می‌شوند (Najafi Pour and Taghavi., 2011).

نتایج این پژوهش نشان داد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی $B_1$ و $B_2$، کلیه سویه ها قادر به سنتز قطعه‌ای DNA به اندازه تقریبی ۷۵۲ جفت باز بودند. این نتیجه تأئیدی بر وجود ژن *syrB* در سویه‌های *Pss* مورد مطالعه است. این نتایج با یافته‌های سورنسن و همکاران و نجفی پور و تقوی تطابق دارد (؛ Najafi Pour & Taghavi, 2011;Najafi Pour and Taghavi, 2013 ؛ Sorensen et al., 1998 ؛ Najafi Pour et al., 2015).

کلیه سویه‌هایی که با آزمون‌های فنوتیپی و PCR تشخیصی، به عنوان *Pss* شناسایی شده بودند، جهت آزمون RFLP مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این راستا ۵ آنزیم HaeIII، EcoRI، KpnI، AluI، HindIII مورد استفاده قرار گرفت که هر یک بطور جداگانه به محصول PCR تشخیصی اضافه شدند. از میان آنزیم‌های مذکور تنها آنزیم HaeIII قادر به ایجاد برش در ژن *syrB* بوده و سایرین فاقد سایت برشی در ژن مورد نظر بودند. برش ژنوم *Pss* با آنزیم HaeIII، قطعاتی با اندازه تقریبی ۳۰۰bp ، ۲۰۰bp و ۱۰۰bp ایجاد کرد. *Pseudomonas syringae pv morspronorum* نیز در آزمون RFLP استفاده شد. آنزیم HaeIII با برش ژنوم *Psm* دو قطعه با اندازه تقریبی ۲۷۰ bp و ۳۸۰bp ایجاد کرد که با قطعات ایجاد شده در *Pss* کاملا متفاوت بود. تجزیه و تحلیل RFLP با استفاده از نرم افزارNtsys-pc اختلاف معنی داری را میان سویه‌های *Pss* هسته داران استان کهگیلویه و بویراحمد نشان نداد. به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی میان سویه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد وجود ندارد و یا آنکه RFLP نمی‌تواند روش مطمئنی برای نشان دادن این اختلاف باشد. زیرا تعداد باندهای مورد بررسی در این روش محدود است و برای یافتن تنوع ژنتیکی در این باکتری باید از روش‌های دیگر در کنار این روش استفاده نمود. تحقیقات سایرین نیز نتایج مشابهی را نشان داده است. سورنسن و همکاران نیز از همین روش جهت مطالعه ژن *syrB* در دو گروه *Pss* استفاده نمودند و نشان دادند که در قطعه ۷۵۲ جفت بازی ژن *syrB* گروه اول هیچ سایت برشی برای آنزیم SalI وجود ندارد، در حالی که این آنزیم در گروه دوم دو برش ایجاد کرد که سبب تولید قطعاتی با اندازه‌های ۱۳۱ جفت بازی و۶۲۱ جفت بازی شد (Sorensen et al., 1998).

علاوه بر این الزاک و همکاران نیز از همین روش و با استفاده از تأثیر آنزیم‌های Hinf1 ، HpaII و TaqI روی ژن *syrB* نشان دادند که سویه‌های *Pss* جداشده از مزارع خیار لهستان با استفاده از این روش هیچ تفاوتی را نشان نمی‌دهند ( Olczak et al., 2007) که با نتایج این پژوهش مطابق است.

با توجه به یافته‌های این پژوهش و نیز تحقیقات مشابه، به نظر می‌رسد آزمون‌های ژنوتیپی به تنهایی قادر به تفکیک سویه‌های بیماری زای *Pss* از یکدیگر نبوده و به این منظور لازم است تلفیقی از آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مانند آزمون بیماریزایی، RAPD و یا سایر روش‌های مشابه استفاده گردد ( Vicente & Roberts., 2007؛ Olczak et al., 2007).

**References**


1. Abbasi V, Rahimian H, and Tajik GMA. 2012. Identification and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of bacterial canker in stone fruits, in several northern and central provinces of Iran. Journal of Plant Production Research (Agricultural Sciences and Natural Resources) 20: 27-48.
2. Abbasi V, Rahimian H, Tajik GMA and Rezaian V. 2013. Evaluation of genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* strains causing agent of bacterial canker in stone fruits, in several northern provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Disease 47: 404-389.
3. Agrios GN. 2005. Plant Pathology, 5th Edition, Academic Press, NewYork, pp. 635.
4. Ahsani H; Nasrollahnejad S; Rahimian H, and Mahmmoudisafa C. 2018. Determination of phenotypic characteristics and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of bacterial canker in stone fruits, in Khorasan Razavi and Shomali provinces. Journal of Plant Pests and Diseases 87: 181-193.
5. Bahar M, Mojtahedi H, and Akhiani A. 1983. Bacterial canker of apricot in Isfahan province. Journal of Plant Disease 18: 58-68.
6. Cirvilleri G, Bonaccorsi A, Scuderi G, and Scortichini M. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. Journal of Phytopathology 153: 654-666.
7. Ebrahimzadeh A, Mohammadi Goltape A, and Rezaei Danesh Y. 2008. Investigation of the causal agent of apricot deterioration in Marand orchards in Iran. 18th Iranian Botanical Congress, Buali Sina University, Hamedan, page 407.
8. Eldaghi M, Rahimian H, and Mohammadi M. 2009. Comparison of phenotypic, serological and molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of bacterial canker in pome fruits and blight symptom in cereals, Iranian Journal of Plant Disease 45: 336-317.
9. Erfani Nik M, Rezaei R, and Chareghani H. 2017. Identification of causal agent of canker disease in stone fruits, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad provinces and comparison of resistance of cherry cultivars. Applied Research in Plant Pathology (Agricultural Knowledge) 7: 31-44.
10. Fahy PC, and Persly GJ. 1983. Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide, Academic Press, Inc., New York, 389 PP.
11. Gardan L, Cottin S, Bollet C, and Hunault G. 1991. Phenotypic heterogenecity of *Pseudomonas syringae* van Hall. Research in Microbiology 142: 995–1003.

12. Hattingh MJ, Roos IMM, and Mansvelt EL. 1989. Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. Plant Disease 73: 784-789.
13. Hirano SS, and Upper CD. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annual Review of Phytopathology 28:155-177.
14. Hirano SS, Rouse DI, Clayton MK, and Upper CD. 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: a study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. Plant Disease 79: 1085-1093.
15. Hirano SS, and Upper CD. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*, a pathogen ice nucleus and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 624-653.
16. Iraqi MM, and Rahnama K. 2018. Determination of epiphyte population of *Pseudomonas syringae pv syringae* on weeds in apricot orchards, affected by bacterial canker. Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Industries) 25: 104-102.
17. Kałużna M, and Sobiczewski P. 2009. Virulence of *Pseudomonas syringae* pathovars and races originating from stone fruit trees. Phytopathologia 54: 71-79.
18. Lelliot RA, and Stead DE. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. In: Preece, T. F. (ed.), Methods in Plant Pathology, Vol. 2 Oxford, Blackwell Scientific Publication Ltd., UK.
19. Little EL, Bostock RM, and Kirkapatric BC. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. Applied Environmental Microbiology 64: 3818-3823.
20. Mosivand M, Rahimian H, and Shams Bakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic correlation of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* strains isolated from sugarcane, stone fruits and wheat. Journal of Plant Disease 45: 85-75.
21. Najafi Pour G, and Taghavi SM. 2011. Comparison of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. Journal of Agricultural Sciences and Technology 13: 431-442.
22. Najafi Pour G, and Taghavi SM. 2013. Comparison of genotypic characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from different hosts using rep-PCR. Journal of Plant Disease Research 2: 1-16.
23. Najafi Pour G, Hasani S, and Taghavi SM. 2014. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* isolated from winter jasmine, using BOX-PCR, in Shiraz. Journal of Microbial World 13:6-17.

24. Najafi Pour G, Jamali E, and Ayazpour K. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of *Erwinia amylovora* in pome fruits in Isfahan Province. Journal of Applied Research in Plant Protection 4: 177-195.
25. Olczak Woltman H, Masny A, Bartoszewski G, Plucienniczak A, and Niemirowicz Szczytt K. 2007. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. Plant Pathology 56: 373-382.
26. Rahimian H. 1997. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringa* pv. *syringae* in Iran. Phytopathology 143: 321-324.
27. Schaad NW, Jones jB, and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota.
28. Sorensen KN, Kim KH, and Takemoto JY. 1998. PCR Detection of cyclic Lipodepsinonapeptide-Producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied Environmental Microbiology 64: 226–230.
29. Stead DE. 1992. Classification of *P. syringae* pathovars by fatty acid profiling, In Proceedings of the Working Group *Pseudomonas syringae*. International Society of Plant Pathology, University of Florence, Florence, Italy. 381:390.
30. Vicente JG, Roberts SJ, Russell K, and Alves JP. 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. European Journal of Plant Pathology 110: 337-351.
31. Yaish MWF. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in common bean. Euphytica 152:397-404.
32. Ziaee M, and Taghavi SM. 2003. Comparison of *pseudomonas syringae pv.syringae van Hall* isolates from different hosts in terms of phenotypic, serological and pathogenic characteristics. Jornal of Soil and Water Sciences 7:199-212.

# Comparison of Phenotypic and Genotypic Features of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Isolated from Stone Fruits Using PCR-RFLP in Kohgiloye and Boyer Ahmad Province

S. Jozarian[1], G. Najafi Pour[*2], K. Ayazpour[2]

Bacterial canker of stone fruit trees caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) is present in all areas where stone fruit trees are cultivated. It is one of the most important diseases of stone fruit trees in Iran. This disease causes deterioration in young trees and yield reduction in old trees (Agrios, 2005). During investigation in different regions of Kohgiloye and Boyerahmad province (Iran), plants showing bacterial canker symptoms were collected. A total of 30 gram-negative isolates were initially identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. All isolates were studied for phenotypic, physiological, pathogenicity, nutritional characteristics, and evaluation of the syrB gene. They were also subjected to genetic analysis via RFLP. All isolates were rod-shaped, gram-negative, motile, and obligate aerobic. They all showed positive reaction in catalase and a hypersensitive reaction on tobacco. Additionally, they produced a fluorescent pigment on Kings' B medium. In LOPAT tests, the results showed negative oxidase, arginine dehydrolysis, and potato rot and, positive hypersensitive reaction and levan production. In numerical analysis of phenotypic characteristics using Ntsys-pc, all isolates showed 90% similarity. The pathogenicity test showed that all strains were infectious on stone fruit plants regardless of their initial hosts. Approximately, a 752 bp DNA fragment was synthesized using B1 and B2 specific primers. In the RFLP test, five enzymes including kpnI, EcoRI, HaeIII, AluI, and HindIII were applied to the syrB gene. Only HaeIII was able to cut the syrB gene. The genetic fingerprint obtained from RFLP was evaluated as identical for all isolates. Results of phenotypic, pathogenicity, and RFLP tests indicate that *Pss* strains isolated from stone fruits in Kohgiloye and Boyerahmad province show high homogeneity.

Keywords: PCR, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, RFLP, Stone fruits, SyrB gene.

[1] -Former B.S. student of Plant Protection Depatment, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2] - Assistant Professor, Department of Plant Protection, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
*Corresponding author: gildanajafipour@gmail.com