

بررسی خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل

شانکر باکتریایی بادام در استان خراسان رضوی با استفاده از BOX-PCR

حمیده احسنی^{1*}، سعید نصرالله نژاد²، حشمت ا... رحیمیان³، اسفندیار ظهور⁴، میثم تقی‌نسب⁵

تاریخ دریافت: 93/6/14 تاریخ پذیرش: 93/9/10

چکیده

شانکر باکتریایی که بوسیله پاتوارهای *Pseudomonas syringae* Van Hall ایجاد می‌شود یکی از مشکلات جدی باغ‌های درختان میوه هسته‌دار می‌باشد. در این تحقیق طی سال‌های 1390-1391 نمونه‌های دارای علائم شانکر از باغات بادام در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شده و جداسازی باکتری انجام شد. عامل بیماری براساس آزمون‌های گروه LOPAT و GATTA، *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (Pss) شناسایی شد. شانزده جدایه خالص سازی شده و مورد بررسی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی قرار گرفتند. جدایه‌ها براین اساس اختلافات جزئی نشان دادند. تشخیص مولکولی جدایه‌ها با واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با آغازگرهای اختصاصی D21 و D22 صورت گرفت. به منظور ارزیابی دامنه تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، از روش BOX-PCR استفاده شد. از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش UPGMA و نرم افزار NTYSYS-pc برای آنالیز خوشه‌ای استفاده شد. در آنالیز خوشه‌ای داده‌ها، جدایه‌ها با آغازگر BOXAIR در سطح تشابه 68 درصد، در 3 گروه قرار گرفتند. نتایج، بیانگر تنوع ژنتیکی جدایه‌های عامل بیماری شانکر درختان بادام در استان خراسان رضوی است.

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

¹ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

² - دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

³ - استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

⁴ - مربی پژوهش، مرکز تحقیقات علوم کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.

⁵ - مربی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان، گرگان، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: hamideh.ahsani@gmail.com

مقدمه

Pseudomonas syringae Van Hall یک باکتری بیمارگر گیاهی است که به بیش از 50 پاتوار و 9 گروه ژنومی تقسیم شده است (Garden *et al.*, 1999). بیماری‌های ایجاد شده توسط پاتوارهای این گونه نگرانی عمده در مناطق تولیدکننده میوه در سرتاسر دنیا به حساب می‌آیند (Kennly *et al.*, 2007). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) در بیش از 180 گونه گیاهی از جنس‌های مختلف بیماری ایجاد می‌کند (Bradbury, 1986). از ابتدایی‌ترین گزارشها شانکر هسته‌داران ناشی از Pss در ایران می‌توان به شانکر باکتریایی زردآلو در اصفهان (Bahar *et al.*, 1982) و شانکر و سرخشکیدگی گیلاس با عامل Pss در دماوند (Banapour *et al.*, 1990) اشاره کرد.

کنترل بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی معمولاً نیازمند تشخیص دقیق و به دنبال آن شناسایی صحیح ارگانیسم عامل بیماری است که روش‌های مبتنی بر نوکلئیک‌اسید حساسیت کافی در این زمینه را دارند (Pallasio-Bielsa *et al.*, 2009). در حال حاضر دامنه وسیعی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در میزبان‌های متعدد شناسایی شده‌اند (Schaad *et al.*, 2001) و گزارش‌های منتشر شده در 15 سال گذشته روند رو به افزایش کاربرد این روش را در آزمایشگاه‌های تشخیصی نشان می‌دهد و پیش‌بینی می‌شود در آینده نیز این روند جهت غربال‌گری سریع نمونه‌ها ادامه یابد (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009).

در دو دهه اخیر براساس توالی‌های تکراری حاضر در ژنوم انواع مختلف گونه‌های باکتریایی، آغازگرهایی طراحی شده‌اند که اثر انگشت ژنتیکی را ایجاد می‌کنند که در ارزیابی تنوع در سطح سویه و پاتوار مفید می‌باشند (Vicent and Roberts, 2007). PCR عناصر تکرارشونده شامل REP-, ERIC-, BOX-, IS50 روش‌های سریع و ساده‌ای هستند که به طور معمول در شناسایی، طبقه‌بندی و بررسی تنوع عوامل شانکر باکتریایی در هسته‌دارها بکار می‌روند (Menard *et al.*, 2003; Vicent *et al.*, 2004; Bultreys and Kaluzna, 2010).

با این وجود به دلیل عدم اطلاعات کافی در رابطه با دقت تکنیک‌های مختلف تشخیصی در مورد بیمارگرهای هسته‌دارها، معمولاً در مورد این بیمارگرها تمایلی برای استفاده تلفیقی از روش‌های متعارف سرولوژیکی و مولکولی وجود دارد (Alvarez, 2004; Lopez *et al.*, 2009). توصیف تنوع جدایه‌ها و تعیین دامنه میزبانی Pss در قرنطینه گیاهی، انتخاب ارقام برای مقاومت، برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک، تشخیص گروه‌های جدایه‌ها و مطالعه ارتباط بین آنها حائز اهمیت است (Kaku, 2003).

طی چند سال گذشته با افزایش سریع سطح زیرکشت درختان بادام در مناطق مختلف استان خراسان رضوی بویژه منطقه کوهسرخ شهرستان کاشمر، علائم شانکر باکتریایی در باغات این منطقه شیوع یافته است. تاکنون مطالعات اندکی در رابطه با بررسی خصوصیات عامل شانکر باکتریایی در درختان هسته‌دار در استان انجام شده است. تحقیق حاضر به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی سویه‌های Pss جداشده از درختان بادام در استان خراسان رضوی و نیز بررسی تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها با استفاده از آغازگر BOXAIR انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌ها

در سال‌های 1390-1391 مناطق عمده کشت درختان بادام در استان خراسان رضوی بازدید شد و از درختان دارای علائم لکه‌برگی و شانکر باکتریایی، نمونه‌هایی از برگ، شاخه و سرشاخه جمع‌آوری و در داخل پاکت‌های مجزا به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه به منظور جداسازی باکتری، نمونه‌ها ابتدا در زیر جریان آب روان و سپس دوبار با آب مقطر استریل شسته شدند. قطعاتی به اندازه تقریبی 0/5 سانتی‌متر از حفاصل قسمت آلوده و سالم و حاشیه شانکر موجود روی شاخه بوسیله تیغ استریل برش داده شده و هریک از قطعات در دو تا سه میلی‌لیتر آب مقطر استریل له گشته و پس از 15 دقیقه سوسپانسیون‌های باکتریایی حاصله در محیط کشت آگار غذایی حاوی سوکروز (Nutrient Agar Sucrose) منخبط شده و پتری‌ها به مدت سه روز در دمای 27°C نگهداری شدند. سپس تک کلونی‌های کرم متمایل به زرد و محدب انتخاب و خالص سازی انجام شد (Radmarker *et al.*, 2000). جهت نگهداری جدایه‌ها از کشت 24 ساعته باکتری، سوسپانسیون غلیظی در میکروتیوب‌های حاوی آب مقطر دوبار استریل، تهیه و در دمای 4°C نگهداری شدند (Schaad *et al.*, 2001).

آزمون بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی روی برگ از کشت‌های یک تا دو روزه جدایه‌های باکتریایی، سوسپانسیون با غلظت تقریبی 10^7 (cfu) $(\text{OD}_{600}=1)$ تهیه گردید، غلظت سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. بوسیله سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و سپس بیست میکرولیتر از سوسپانسیون بوسیله سرنگ روی سطح برگ‌های سالم نهال هلو پاشیده شد. جهت تأمین رطوبت، سطح برگ‌ها با آب‌پاش خیس شده و یک پوشش نایلونی روی برگ‌ها قرار داده شد (Mohammadi *et al.*, 2001). تیمارها به مدت حداکثر یک ماه جهت مشاهده علائم احتمالی نگهداری شدند.

به منظور اثبات بیماری‌زایی روی سرشاخه بیست میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به وسیله سرنگ انسولین به زیر پوست سرشاخه‌های جوان و سالم نهال بادام تزریق شد. ظهور شانکر یا زخم‌های فرورفته از یک هفته تا یک ماه پس از مایه زنی بازبینی گردید (Thomidis *et al.*, 2005).

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها

کلیه جدایه‌ها به همراه دو جدایه استاندارد (اهدایی دکتر Kaluzna از لهستان) در آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین واکنش گرم، آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی، واکنش فوق حساسیت، تولید رنگدانه فلورسنت، اکسیداز، تولید لوان، آزمون کاتالاز، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، تحمل نمک طعام، تولید گاز از گلوکز و هیدرولیز اسکولین و سایر آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای با استفاده از روش‌های متداول در باکتری شناسی گیاهی انجام گردید (Schaad *et al.*, 2001) (جدول 2).

³ Colony forming unit

استخراج دی‌ان‌ای ژنومی

بدین منظور سوسپانسیون از کشت 24 ساعته هر جدایه در 500 میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. جهت تجزیه سلول‌ها، به هر سوسپانسیون به میزان 0/1 حجم پتاس 10% اضافه و نمونه‌ها به مدت 3 دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه تجزیه شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه با سرعت 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و لایه رویی برداشته شده و در دمای 20°C - نگهداری شدند (Schaad *et al.*, 2001).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

جهت تشخیص مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی (D21 AGC 5' و D22 3' CGT AGG GGA ACC TGC GG 3') و روش مانسو و هورویس استفاده شد. برنامه تکثیر دی‌ان‌ای شامل، واسرشت‌سازی اولیه در دمای 95°C به مدت 7 دقیقه و سپس 35 چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت 2 دقیقه، اتصال آغازگر به دی‌ان‌ای در دمای 60°C به مدت 1 دقیقه و گسترش در دمای 72°C به مدت 1 دقیقه و در آخر بسط نهایی در دمای 72°C به مدت 2 دقیقه انجام گرفت (Manceau and Horvais, 1997).

جهت بررسی تنوع ژنتیکی، واکنش BOX-PCR با استفاده از آغازگر BOXA1R (سیناژن، ایران) با ترادف (5' BOXA1R 3' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3')، انجام شد. برنامه تکثیر دی‌ان‌ای با آغازگر BOXA1R (Versalovic *et al.*, 1991) با واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت 4 دقیقه و سپس 37 چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت 1 دقیقه، اتصال آغازگر به دی‌ان‌ای در دمای 51°C به مدت 45 ثانیه و گسترش در دمای 72°C به مدت 2 دقیقه و در آخر بسط نهایی در دمای 72°C به مدت 15 دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر دو آغازگر در حجم 25 میکرولیتر حاوی 23 میکرولیتر محلول پایه به همراه 2 μl از دی‌ان‌ای ژنومی انجام گرفت. نوع و غلظت مواد در محلول شامل 0/2 mM مخلوط dNTPs، غلظت 1X بافر PCR، 1/5 mM محلول کلرید منیزیم (MgCl_2)، 2/5 Unit آنزیم Taq DNA polymeras و 10 pM از هر آغازگر بود.

الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگاروز 1/2 درصد و در بافر TBE (1X) و به مدت 1/5 ساعت در ولتاژ ثابت 80 ولت انجام شد و پس از آن ژل به مدت 20 دقیقه با اتیدیوم بروماید (یک میلی‌گرم در لیتر) رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی

ابتدا نقوش الکتروفورزی جدایه‌ها با هم مقایسه شدند و به تمامی باندهایی که برای هر جدایه به‌دست آمد، عدد صفر برای نبود هر باند و عدد یک برای وجود هر باند نسبت داده شد. سپس ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و براساس ضریب تشابه جاکارد و روش داده‌های غیروزی (UPGMA) انجام گرفت.

نتایج

جداسازی جدایه‌ها

در این تحقیق 16 جدایه از نمونه‌های آلوده شاخه و برگ درختان بادام روی محیط آگار مغذی جداسازی گردید. مشخصات مربوط به جدایه‌ها در جدول یک آمده است.

جدول 1- مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* مورد این پژوهش.

کد جدایه	موقعیت جغرافیایی / سال	میزبان
B ₁ B ₅ B ₆ B ₁₁	کوهسرخ / 1390	بادام
B ₂ B ₃ B ₄	کاشمر / 1390	بادام
B ₁₅ B ₁₄ B ₉	سبزوار / 1390	بادام
B ₁₂	مشهد / 1390	بادام
B ₈ B ₇	کوهسرخ / 1391	بادام
B ₁₆	مشهد / 1391	بادام
B ₁₃ B ₁₀	نیشابور / 1391	بادام
RIPF110*	لهستان / 2007	آلو
RIPF760*	لهستان / 1997	گیلاس

* اهدایی دکتر مونیکا کالوزنا Pss جدایه‌های استاندارد

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

پررنگه جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی مدور، به رنگ کرم متمایل به زرد، لزج و برآمده و روی محیط YDC کرم رنگ و غیرلزج با حاشیه صاف بودند. جدایه‌ها قادر به تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB بودند. خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌ها از جمله واکنش گرم، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB، متابولیسم گلوکز در شرایط هوازی، تولید کاتالاز، عدم احیای نیترات و عدم تولید ایندول با خصوصیات جنس سودوموناس مطابقت داشت (Palleroni, 2005). بنابراین جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق بطور مقدماتی متعلق به جنس سودوموناس تشخیص داده شده و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام شد. در آزمون‌های گروه LOPAT، جدایه‌ها به خاطر تولید لوان، عدم تولید اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز، نداشتن توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ‌های شمعدانی جزء گروه یک سودوموناس‌ها قرار گرفته و به عنوان *Pseudomonas syringae* تشخیص داده شدند (Palleroni, 2005). سایر خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها شامل آزمون‌های GATa (ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، فعالیت تیروزیناز و استفاده از تارتارات)، رشد در نمک طعام 5 درصد، تولید اسید از اینوزیتول، آرابینوز، سوربیتول، مانیتول، مانوز، استفاده از سیترات و رشد در دمای 37 درجه سانتیگراد با خصوصیات پاتوار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* مطابقت داشت (Schaad et al., 2001). نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها در جدول دو آمده است.

جدول 2- نتایج آزمون های بیوشیمیایی و فنوتیپی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از درختان بادام در استان خراسان رضوی.

نتیجه واکنش	نام آزمون	نتیجه واکنش	نام آزمون
-	تولید H ₂ S از سیستئین	-	واکنش گرم
-	تولید H ₂ S از پپتون	-	اکسیداز
-	تولید H ₂ S از تیوسولفات سدیم	+	تولید لوآن
-	متیل رد	-	لهانیدن سیبزمینی
-	تولید ایندول استیک اسید	+	واکنش فوق حساسیت
+	فسفاتاز	-	آرژنین دهیدرولاز
-	کتولاکتوز	+	رشد در دمای 4 ° C
+	استفاده از گلوکز	-	رشد در دمای 39 ° C
+	سوکروز	+	کاتالاز
+	سوربیتول	v	هیدرولیز ژلاتین
+	گالاکتوز	-	نشاسته
+	فروکتوز	+	توئین 80
+	مانیتول	-	کازئین
+	مانوز	v	اسکولین
+	آرابینوز	-	لسیتیناز
-	تری هالوز	-	تیروزیناز
-	اینوزیتول	+	تحمل نمک طعام 5 درصد
+	سلوبیوز	-	تحمل نمک طعام 7 درصد
-	رافینوز	+	رشد هوازی
+	رامنوز	-	رشد بی هوازی
-	لاکتوز	+	اوره آز
+	سیترات	-	احیای نیترات

+ : واکنش جدایه ها مثبت بود - : واکنش جدایه ها منفی بود ، v : واکنش جدایه ها متغییر بود

با توجه به ویژگی های فنوتیپی ذکر شده، جدایه های به دست آمده در این مطالعه، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* تشخیص داده شدند. نتایج بررسی حاضر با نتایج کسب شده توسط سماواتیان (2006) مطابقت داشت. وی عامل شانکر باکتریایی و بلاست شکوفه در باغات بادام استان اصفهان را *Pss* شناسایی کرد. همچنین نتایج پژوهش حاضر با یافته های لوپز و همکاران (Lopez et al., 2010) که *Pss* را از روی درختان بادام گزارش کرده اند نیز مطابقت داشت. در مجموع نتایج بررسی های فنوتیپی نشان داد که جدایه های مورد بررسی در این مطالعه دارای خصوصیات فنوتیپی تقریباً مشابهی با هم هستند. مطالعات قبلی نیز بیانگر تشابه زیاد بین جدایه های مختلف *Pss* از لحاظ ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی می باشد (Aldaghi et al., 2009). موسیوند و همکاران (2009) در بررسی خود نشان دادند که همه جدایه های *Pss* از نیشکر، درختان میوه هسته دار و گندم خصوصیات بیوشیمیایی

مشابهی داشتند. نجفی پور و همکاران (2011) خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های متعلق به تعدادی از هسته‌داران و دانه‌داران را با استفاده از نرم افزار NtSys -pc تحت آنالیز عددی قرار داده و دریافتند که این سویه‌ها دارای 90% تشابه با یکدیگر هستند. عباسی و همکاران (2013) نیز اظهار داشتند که واکنش تمامی جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه آنها، در آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مشابه یکدیگر بودند. به نظر می‌رسد تکیه بر نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، به‌تنهایی برای نشان دادن تفاوت‌های تعیین‌کننده در سطح پاتوار چندان اطمینان‌بخش نیست (Hildebrand *et al.*, 1982).

نتایج آزمون بیماری‌زایی

از آنجایی که *Pss* می‌تواند در سطح گیاه به صورت اپی فیت بقا داشته باشد (Schaad *et al.*, 2001) بنابراین همراهی باکتری با گیاه، دلیلی بر بیماری‌زایی آن نبوده و انجام آزمون بیماری‌زایی ضروری است. چهار تا هفت روز پس از تزریق سوسپانسیون به پشت برگ‌ها، لکه‌های آسوخسته مشاهده شد که این لکه‌ها بتدریج از قسمت وسط نکرور شدند و روی شاخه‌ها نیز زخم‌های سیاه فرورفته مشاهده شد. جدایه‌های استاندارد نیز در آزمون بیماری‌زایی علائم مشابهی را نشان دادند. برای حصول اطمینان از بیماری‌زایی جدایه‌ها، عامل بیماری‌زا، از این لکه‌ها و زخم‌ها مجدداً جداسازی شدند (شکل 1). تفاوت ناچیزی در شدت بیماری‌زایی و مدت زمان لازم برای ظهور علائم بیماری در بین جدایه‌ها مشاهده گردید. نتایج مشابه در مطالعه‌های قبلی نیز به‌دست آمده است (Little *et al.*, 1998; Abbasi *et al.*, 2013).

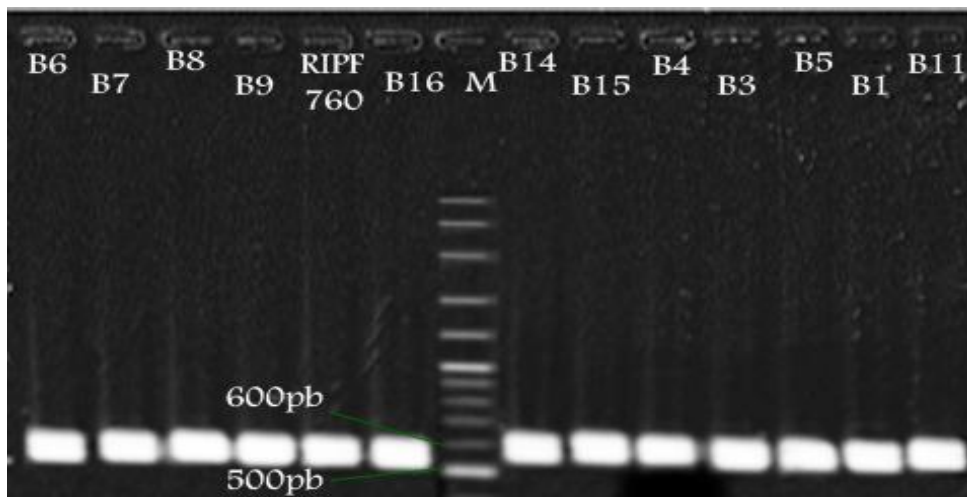


شکل 1- نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* سمت راست: علائم لکه نکرور روی برگ سمت چپ: علائم شانکر روی شاخه

تشخیص جدایه‌های *Pss* بوسیله PCR

دی‌ان‌ای ژنومی هریک از جدایه‌هایی که با آزمون‌های افتراقی بعنوان *Pss* شناسایی شده بودند، در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی D21 و D22 قطعه‌ای دی‌ان‌ای با اندازه تقریبی 500 تا 600 جفت‌باز ایجاد

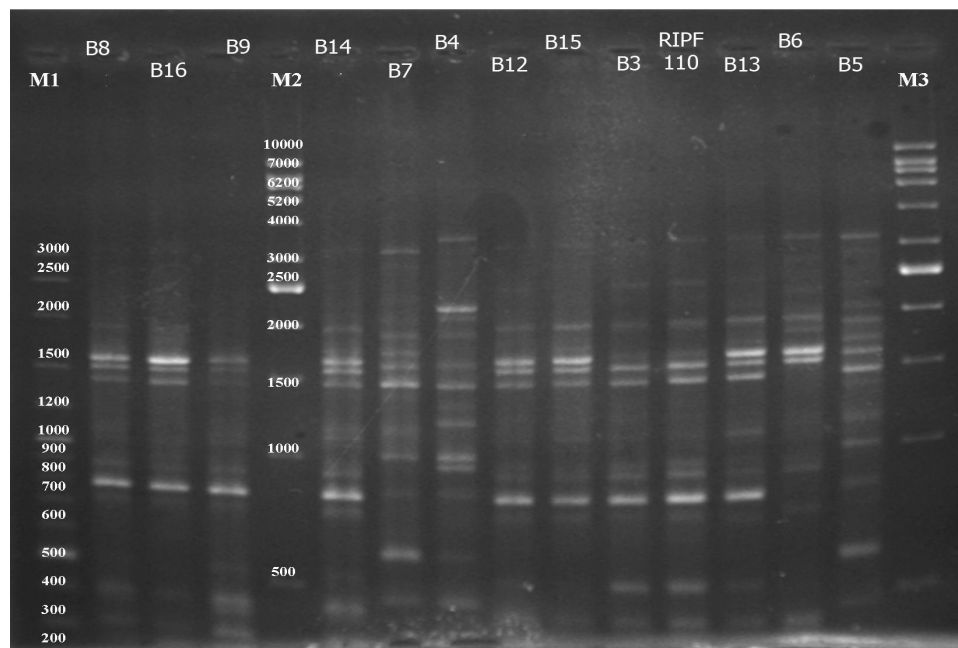
کردند. این باندها شبیه به دو جدایه استاندارد *Pss* (RIPF760 و RIPF110) بودند (شکل 2). دو باند نزدیک به هم نشان دهنده وجود چند اپران در ژنوم این باکتری‌ها می باشد (Manceau and Horvais., 1997).



شکل 2- تکثیر دو قطعه از DNA جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در محدوده 500 تا 600 bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی D21 و D22 (M: استاندارد جرم مولکولی - نام هر جدایه در بالای هر چاهک ذکر شده است).

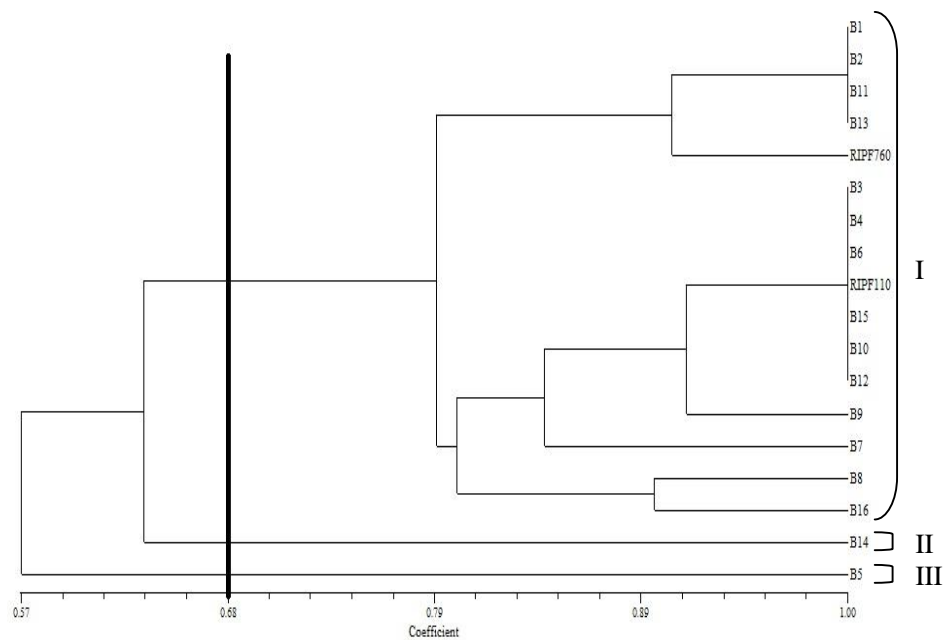
آزمون BOX-PCR

دی‌ان‌ای ژنومی هریک از جدایه‌ها با آغازگر BOXA1R تکثیر گردید (شکل 3). با استفاده از این آغازگر قطعاتی از دی‌ان‌ای با اندازه‌های تقریبی باندها 200 تا 3500 جفت‌باز تکثیر شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده با این آغازگر نشان داد که در سطح تشابه 68 درصد، جدایه‌ها به 3 گروه تقسیم می‌شوند. از بین جدایه‌های به دست آمده 14 جدایه در یک گروه و دو جدایه B5 و B14 در دو گروه مجزا قرار گرفتند (شکل 4). نتایج به دست آمده تنوع ژنتیکی را در بین جدایه‌های عامل بیماری شانکر درختان بادام در استان خراسان رضوی نشان می‌دهد. با این حال رابطه مشخصی بین جدایه‌ها و منطقه جغرافیایی آنها وجود نداشت و همبستگی نیز بین کلاسترها و مشخصات فنوتیپی مشاهده نشد.



شکل 3- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌ها حاصل از BOX-PCR با آغازگر BOXAIR. M1، M2 و M3: استاندارد جرم مولکولی - نام هر جدایه در بالای هر چاهک ذکر شده است.

نجفی پور و تقوی (2011) جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف را براساس آزمون‌های بیماری‌زایی و روش BOX-PCR مورد بررسی قرار داده و کارایی این روش، در تفکیک جدایه‌های هسته‌داران، غلات و دانه‌داران را در گروه‌های نسبتاً متمایز نشان دادند. به نظر می‌رسد استفاده از آغازگر BOXAIR در آزمون rep-PCR روشی سریع و مناسب برای بررسی پلی‌مورفیسم می‌باشد، بدون آن که نیاز به دی‌ان‌ای خالص باکتری باشد، به طوری که در این بررسی در مرحله استخراج دی‌ان‌ای از روش تجزیه قلیایی استفاده شد که روشی سریع، ساده و کم هزینه می‌باشد. پیش از این نیز سرعت، دقت و توانایی این روش در موارد زیادی، در خصوص جدایه‌های *Pss* به اثبات رسیده است (Radmarker *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2002; Kang and Dunne, 2003; Menard *et al.*, 2003;) (Vicent *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2009; Bultreys and Kaluzna, 2010).



شکل 4- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از بادام در کنار دو جدایه استاندارد *Pss* به نام RIPF760 و RIPF110، حاصل از BOX-PCR (دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است).

References

1. Abbasi V, Rahimian H and Tajick-Ghanbari A. 2013. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal Plant Pathology* 135: 225–235
2. Aldaghi M, Mohammadi M, Rahimian H and Sharifi-Tehrani A. 2000. Serological and molecular comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from stone fruit trees, wheat and barley. Paper presented at: 14th Iranian Plant Protection Congress; 5–8 September; Isfahan, Iran.
3. Alvarez A M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 42: 339–366.
4. Arabi F, Nikravesh Z, Babaezad V, Rezaeean V and Rahimian H. 2006. Occurrence of bacterial leaf spot of garden beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 42: 655–671.
5. Bahar M, Mochtahedi H and Akhiani A. 1982. Bacterial canker of apricot in Esfahan. *Iranian Journal of Plant Pathology* 18: 58–68.
6. Banapour A, Zakiee Z and Amani G. 1990. Isolation of *Pseudomonas syringae* from sweet cherry in Tehran Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 26:67–72.
7. Bradbury J F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, England. 332p.
8. 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* race1 and race2. *Journal of Plant Pathology* 92: S1.21–S1.33.
9. Dawson S L, Fry J C and Dancer B N. 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent *Pseudomonas*. *Journal of Microbiological Methods* 50: 9–22.
10. Garden L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F and Grimont P A. 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 of Systematic Bacteriology* 49: 469-478.
11. Gilbert V, Legros F, Maraite H and Bultreys A. 2009. Genetic analyses of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae*, and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. *European Journal of Plant Pathology* 124: 199–218.
12. Hildebrand D C, Schorth M N and Huisman O C. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basis for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. *Annual Review of Phytopatholog.* 20: 235–256.
13. Kaku H. 2003. Genetic diversity and infection mechanism of plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* 69: 412–414.
14. Kang H P and Dunne W M. 2003. Stability of repetitive-sequence PCR patterns with respect to culture age and subculture frequency. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2694–2696.

15. Kennelly M M, Cazorla F M, Vicente A, Ramos C and Sundin G W. 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees progress toward understanding and control. *Plant Disease* 91: 4–17.
16. Little E L, Bostock R M and Kirkpatrick B C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3818–3823.
17. Lopez M M, Llop P, Olmos A, Mico-Noales E, Cambra M and Bertolini E. 2009. Are the molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. *Current Issues in Molecular Biology* 11: 13–46.
18. Lopez M M, Rosello M and Palacio-Bielsa A. 2010. Diagnosis and detection of the main bacterial pathogens of stone fruit and almond. *Journal of plant pathology* 92: S1.57–S1.66
19. Manceau C and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 491–505.
20. Menard M, Sutra L, Luisetti J, Prunier J P and Gardan L. 2003. *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.) the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *European Journal of Plant Pathology* 109: 565–576.
21. Mohammadi M, Ghasemi A and Rahimian H. 2001. Phenotypic characterization of Iranian of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, the causal agent of bacterial canker disease of stone fruit trees. *Journal Agricultural Science and Technology* 3: 51–65.
22. Mousivand M, Rahimian H and Shamsbakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from sugarcane, stone fruits and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45: 75–85.
23. Najafi Pour G and Taghavi S M. 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.
24. Palacio-Bielsa A, Cambra M A and López M M. 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology* 91: 249–297.
25. Palleroni N J. 2005. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. pp. 323–379. In D J Brenner, N R Krieg and J T Staley (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edition). The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, Vol. 2. New York: Springer.
26. Radmarker J W, Hoste B, Louws F J, Kersters K, Swing J, Vauterine L, Vauterin P and de Bruijn F J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 665–677.
27. Samavatian H. 2006. Identification and distribution of bacterial disease agent of almond tree canker in Isfahan province. *Acta Horticulture* 726: 667–671.
28. Schaad N W, Jones J B and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Third edition. St Paul: APS Press. USA. 373p.

-
29. Thomidis T, Tsipouridis C, Exadaktylou E and Drogoudi P. 2005. Comparison of three laboratory methods to evaluate the pathogenicity and virulence of ten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains on apple, pear, cherry and peach trees. *Phytopathology* 33: 137–140.
 30. Versalovic J, Koeuth T and Lupski J R. 1991. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823–6831.
 31. Vicent J G and Roberts S J. 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolated from sweet and wild cherry using rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 117: 383–392.
 32. Vicent J G, Alves J P, Russell K and Roberts S J. 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. *European Journal of Plant Pathology* 110: 337–351.

Study of phenotypic characteristics and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, the causal agent of almond bacterial canker in Khorasan Razavi province using BOX-PCR

H. Ahsani*¹, S. Nasrollahnejad², H. Rahimian³, E. Zohour⁴, M. Taghi Nasab⁵

Abstract

Bacterial canker caused by pathovars of *Pseudomonas syringae* Van Hall is one of the serious problems in stone fruit productions. In this research samples with canker symptoms were collected from Khorasane Razavi province during 2011–2012 and bacterial isolation was performed. The bacterial strains were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) on basis of LOPAT and GATTa tests and were confirmed as the causal agent of the almond bacterial canker based on the pathogenicity tests. A total of 16 isolates were characterized based on physiological and biochemical tests. The isolates showed a few differences in phenotypic characteristics. Genomic DNA from strains was used in PCR with D21 and D22 primers. To assess genetic diversity among the strains, rep-PCR analysis was performed using BOXA1R primer. Similarity matrix of the strains was calculated using the Jaccard's coefficient and cluster analysis was performed by UPGMA method using NTSYS-pc. The strains were divided into 3 clusters with BOXA1R at 68% similarity level. The results demonstrated considerable genetic diversity among strains causing canker in almond trees.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, bacterial canker, almond, genetic diversity, BOX-PCR.

¹ - Former MSc student, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.

² - Associate Professor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.

³ - Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

⁴ - Research Instructor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources center, Mashad, Iran.

⁵ - Instructor, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran

*Corresponding author: hamideh.ahsani@gmail.com