Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

47(1), Spring, 2024

10.22055/ppr.2024.47021.1749

Evaluation of peach cultivars for resistance to bacterial canker disease and detection of pathogenicity genes in different isolates

R. Rezaei [1*], K. Keshavarz [2], H. Karimipour Fard [2], S. Askari [3]

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran (rrezaei@yu.ac.ir)
2. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Kohgiluyeh and Boyerahmad Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yasouj, Iran
3. M.Sc., Agriculture Jihad Organization of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Yasouj, Iran

Received: 26 May 2024 Accepted: 25 June 2024

Background and Objectives

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*Pss*) poses a significant threat to agricultural ecosystems due to its broad host range, encompassing over 200 plant species. Disease-causing bacteria infect all aboveground plant organs throughout the season, causing symptoms such as fruit spots, necrosis, dead buds, flower blight, and cankers on stems and branches**.** The control of diseases caused by *Pss* is almost impossible because of the lack of effective chemical or biocontrol agents, the low number of resistant cultivars and the endophytic nature of the pathogen. Different pathogenic strains have a large genetic variability adaptable to different hosts, cultivars, and pedoclimatic conditions, making it difficult to control bacterial canker. One of the most viable and economical methods for managing bacterial canker in peaches is to use resistant cultivars. The present study aims to determine the resistance reactions of peach cultivars against *Pss*.

Materials and Methods

During 2016-2018, bacterial strains were isolated from stone fruit plants with leaf spot, canker, and gummosis symptoms. Physiological, biochemical, and molecular tests were performed on all isolated strains. To evaluate the resistance of peach cultivars, *Pss* was inoculated to two-year-old seedlings of different peach cultivars, including Zaferani, Alberta, Anjiri, and Hastejoda. Different pairs of primers were used to detect virulence genes in *Pss* isolates.

Results

Isolates were rod-shaped, motile, gram-negative, obligate aerobe, oxidase negative, catalase, levan and tobacco hypersensitive reaction positive, arginine dihydrolase, and potato rot negative. Additionally, all isolates harbored the genes responsible for syringomycin synthesis (*syrB*) and syringomycin secretion (*syrD*). Based on these phenotypic and genotypic characteristics, along with the results of pathogenicity tests and PCR analysis, all isolates were identified as *Pss*. Various primers were used to detect important virulence genes in different *Pss* isolates. The syringomycin synthesis gene (*syrB*) was detected in all *Pss* isolates. The *sypA* gene was detected in *Pss* strains H2, H3, H4, and H5, and the *sypB* gene was detected in *Pss* strains H2, H34, H5, and G1.

Moreover, *nit* gene was detected in H4 and H5 isolates, and *ach* gene was detected in strains H1, H2, and H4. *Pss* strains H3, H4, and H5 produced the expected 1128 bp product after amplification with hrmA1 and hrmA2 primers. Four cultivars, namely Alberta, Zaferani, Hastejoda, and Anjiri, were chosen for the study to investigate the resistance of peach plants.

Significant variations were observed among the different cultivars regarding the number of necrotic lesions on the leaves and the length of the necrotic regions on the branches. Among the cultivars examined, Anjiri showed the highest susceptibility to *Pss*, while Hastejoda exhibited the least sensitivity, indicating potential resistance to the pathogen.

Discussion

Besides its usage for fresh fruit, canned fruit, dried fruit snacks, and fruit juice, peach trees are considered ornamental plants attributed of their white, pink, or red flowers during springtime. Commercial peach production is challenging for multiple reasons. One of them involves its susceptibility to many diseases that can significantly affect fruit yield and quality, and some can also impact the longevity of the trees. The enormous efforts carried out over the last two decades have led us to gain a more in-depth understanding of the *P. syringae* pv. *syringae*-host interactions. In Iran, there are no effective treatments for controlling bacterial canker of stone fruits caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Host tolerance to plant pathogens is important for developing cost-effective and environmentally safe strategies for disease management. Similarly, using resistant cultivars in crop improvement is critical since plants and plant products are usually protected from, rather than cured, diseases. Resistant genotypes will allow sustainable control with zero pesticide residues on fruits, improving the safety of harvesting and decreasing disease problems during storage, thereby leading to enhanced economic benefits.

Keywords: Bacterial canker, Pathogenicity, Peach cultivars, Resistance.

Associate editor: S. Baghaee Ravari (Ph.D.)

Citation: Rezaei, R., Keshavarz, K., Karimipour Fard, H. & Askari, S. (2024). Evaluation of peach cultivars for resistance to bacterial canker disease and detection of pathogenicity genes in different isolates. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *47*(1), 44-59. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2024.47021.1749.

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ۴۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

10.22055/ppr.2024.47021.1749

ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام هلو به بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران و ردیابی ژن‌های بیماری‌زایی در جدایه‌های مختلف

رسول رضائی *[۱]، کاووس کشاورز [۲]، هادی کریمی پور فرد [۲]، شهرام عسکری [۳]

۱-* **نویسنده مسوول**: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران (rrezaei@yu.ac.ir)

۲-استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

۳-کارشناسی ارشد، سازمان جهاد کشاورزی استان کهگیلویه و بویراحمد، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۵

چکیده

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، بیمارگر خطرناکی است که در بیش از ۱۵۰ گونه گیاهی بیماری ایجاد می‌کند. با توجه به خسارت زیاد بیماری در درختان هسته‌دار، هدف از انجام این تحقیق بررسی مقاومت برخی ارقام هلو نسبت به عامل بیماری و ردیابی ژن‌های دخیل در پرآزاری شامل *syrB*، *syrD*، *sypA*، *sypB*، *nit*، *ach* و *hrmA* در جدایه‌های مختلف بود. از درختان هسته‌دار دارای علائم بیماری مانند، لکه برگی و شانکر همراه با صمغ در شاخه و تنه، جدایه‌های مختلف باکتریایی جداسازی گردید. جدایه‌های مورد آزمایش، متحرک، میله‌ای، هوازی اجباری، گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، لوان مثبت، آرژنین دهیدرولاز منفی، واکنش فوق حساسیت مثبت و فاقد توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی بودند. در آزمون PCR، ژن‌های مرتبط با تولید زهرابه سیرینگومایسین (*syrB* و *syrD*) در تمام جدایه‌های مورد بررسی ردیابی شده و بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، بیماری‌زایی و ملکولی، جدایه‌ها به عنوان *Pss* شناسایی گردیدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مهم‌ترین ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های مختلف ردیابی شدند. ژن مسئول تولید زهرابه سیرینگومایسین (*syrB*) در تمام جدایه‌های مورد مطالعه، تکثیر شد. ژن *sypA* مسئول تولید زهرابه سیرینگوپپتین، در جدایه‌های H2، H3، H4 و H5 و ژن *sypB* در جدایه‌های H2، H4، H5 و G1 ردیابی گردید. در جدایه‌های H4 و H5 ژن *nit* مسئول تولید آنزیم نیتریلاز، شناسایی و ژن تولید کننده سیدروفور اکروموباکتین (*ach*) در جدایه‌های H1، H2 و H4 ردیابی گردید. در آزمون تشخیصی PCR با استفاده از پرایمرهای $hrmA_1$ و $hrmA_2$، جدایه‌های H3، H4 و H5 یک قطعه ۱۱۲۸ جفت باز را تولید کردند. از نظر شاخص‌های بیماری‌زایی، بین ارقام آلبرتا، زعفرانی، هسته‌جدا و انجیری اختلاف معنی‌دار وجود داشت. براساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، رقم انجیری بیشترین حساسیت و رقم هسته‌جدا کمترین حساسیت به باکتری *Pss* را داشتند. استفاده از ارقام مقاوم در تلفیق با سایر روش‌ها در کاهش خسارت بیماری شانکر هسته‌داران در باغات از اهمیت بالایی برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: ارقام هلو، بیماری‌زایی، شانکر، مقاومت

دبیر تخصصی: دکتر ساره بقائی راوری

مقدمه

با توجه به ویژگی‌های جغرافیایی منحصر به فرد و اقلیم‌های متنوع، ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولیدکننده میوه‌های هسته‌دار در جهان است. کل تولید هلو و شلیل در جهان سالیانه حدود ۲۵ میلیون تن است که از حدود ۱/۵ میلیون هکتار باغ‌های هلو و شلیل جهان بدست می‌آید (FAOSTAT, 2023). نتایج آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی نشان می‌دهد که تولید هلو و شلیل در ایران در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ حدود ۱/۱۷ میلیون تن با سطح زیرکشت ۷۸/۵ هزار هکتار و متوسط عملکرد حدود ۱۶ تن در هکتار بوده است. با افزایش جمعیت و نیاز به افزایش صادرات این محصولات، برنامه‌ریزی کارآمد برای توسعه باغات و افزایش تولید این محصولات امری ضروری است. یکی از راهکارهای موثر برای افزایش تولید محصولات باغی، کنترل بیماری‌ها است (González et al., 2003). از بیماری‌های مهم درختان هسته‌دار، شانکر باکتریایی بوده که به وسیله‌ی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ایجاد می‌شود. این باکتری متعلق به قلمرو *Bacteria* و رده‌ی *Gammaproteobacteria* بوده و مهم‌ترین پاتووار آن *P. syringae* pv. *syringae* می‌باشد (Kersters et al., 1996). این بیماری در استان‌های تهران، فارس، مازندران، آذربایجان غربی، کهگیلویه و بویراحمد، مرکزی، گلستان و کردستان اهمیت بسیاری دارد و سالانه خسارات زیادی را به درختان میوه‌ی هسته‌دار وارد می‌کند (Erfani-Nik, 2016). عدم آشنایی کشاورزان با این بیماری و نیز نبود روش‌های کنترل موثر برای آن، از جمله عوامل اصلی افزایش خسارت‌ها و نابودی درختان می‌باشد (Hulin et al., 2018). میزبان‌های اصلی بیمارگر، درختان میوه‌های هسته‌دار به ویژه هلو، آلبالو، زردآلو وگیلاس هستند. علاوه بر این، درختان گلابی، بادام، مرکبات و غلات دانه‌ریز نیز می‌توانند به عنوان میزبان برای این بیمارگرها عمل کنند و باعث انتقال و افزایش آلودگی شوند (Kaluzna et al., 2010). این بیماری می‌تواند منجر به کاهش هم‌زمان کمیت و کیفیت محصولات شود و عمر باغ را کاهش دهد. همچنین، در باغ‌های جوان می‌تواند باعث کاهش تولید از ۱۰ تا ۷۵ درصد و در باغ‌های مسن از ۱۰ تا ۲۵ درصد خسارت وارد کند (Marroni et al., 2023). شدت علائم بیماری به عوامل مختلفی نظیر سن گیاه، نوع رقم، و شرایط محیطی بستگی دارد. از نشانه‌های بیماری می‌توان به مرگ گل، ایجاد لکه‌های نکروز روی برگ با هاله زردرنگ، سرخشکیدگی، ایجاد شانکر و تراوش صمغ از محل آلودگی و در نهایت مرگ درخت اشاره نمود (Ogawa et al., 1995). شانکرها در اواخر زمستان و اوایل بهار ظاهر می‌شوند که همراه با تولید صمغ می‌باشند. زمستان‌گذرانی بیمارگر در محل شانکرها و هم‌چنین برخی علف‌های هرز انجام می‌پذیرد. اولین علائم بیماری در بهار ظاهر می‌گردد و رطوبت بالا به همراه باد شیوع بیماری را افزایش می‌دهد (Kennelly et al., 2007). با توجه به این موضوع که باکتری *Pss* به بیش از ۱۵۰ گونه‌ی گیاهی حمله کرده و دامنه میزبانی وسیعی دارد، اصطلاح پاتووار برای این باکتری کاربردی نمی‌باشد. اکثر جدایه‌ها روی محیط کشت KB، تولید رنگدانه‌ای فلورسنت می‌کنند. در اغلب موارد رنگ پرگنه‌های باکتری روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) کرم رنگ می‌باشد (Gasic et al., 2012). سه پاتووار اصلی عامل شانکر هسته‌داران از طریق آزمون‌های فنوتیپی به راحتی قابل تمایز نیستند. به همین دلیل، از روش‌های ملکولی نظیر PCR برای ردیابی عامل بیماری‌زا استفاده می‌شود (Gasic et al., 2012). از جمله مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی در باکتری *Pss* می‌توان به زهرابه‌های سیرینگوپپتین، سیرینگومایسین، پروتئین‌های هسته‌یخ، نیتریلاز و افکتورهای سیستم ترشحی نوع III اشاره نمود. زهرابه‌های سیرینگوپپتین و سیرینگومایسین بر تراوایی غشای‌سلولی گیاه تاثیر گذاشته و سبب افزایش بیماری‌زایی می‌شوند (Scholz-Schroeder et al., 2003). درحضور برخی مولکول‌های سیگنالی مانند مواد قندی و فنولی، این زهرابه‌ها به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کنند. این زهرابه‌ها توسط کلاسترهای ژنی syr-syp کد می‌شوند که با شناسایی این

نواحی ژنتیکی، می‌توان باکتری را تشخیص داده و برای کاهش بیماری‌زایی مورد بررسی قرار داد (Wang et al., 2006). کنترل شانکر باکتریایی به دلیل فقدان سموم یا مهار زیستی مناسب و همچنین خصوصیت درون‌رستی عامل بیماری، به طور کلی موفقیت‌آمیز نبوده است. این باکتری معمولاً مقاوم به سموم شیمیایی است و روش‌های مهار زیستی نیز به دلیل پیچیدگی زیستی این باکتری و تأثیرات ناپایداری که ممکن است داشته باشد، عملکرد مطلوبی در کنترل بیماری نداشته‌اند (Gilbert et al., 2010). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند استرپتومایسین معمولاً مقرون به صرفه نیست و می‌تواند منجر به ایجاد مقاومت در جمعیت‌های باکتری شود (Verhaegen et al., 2023). استفاده از ترکیبات مسی نیز برای کنترل این بیماری معمول است، اما به دلیل پایداری بالا، ممکن است وارد چرخه‌های اکولوژیک شده و مشکلات زیست محیطی را به همراه داشته باشد. بنابراین، انتخاب روش‌های مناسب کنترلی باید با توجه به تأثیرات جانبی و موانع محتمل صورت گیرد (Rabiey et al., 2020). در حال حاضر، یکی از چالش‌های اساسی در کنترل بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران، تولید و پرورش ارقام مقاوم است. با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری، مشکلات مرتبط با استفاده از روش‌های کنترل شیمیایی و عدم کنترل مؤثر، استفاده از ارقام مقاوم می‌تواند راه‌حلی کم هزینه، پایدار و غیرشیمیایی برای مدیریت بیماری باشد. مقاومت گیاه به ویژگی‌های فیزیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن بستگی دارد و چالش‌هایی نظیر زمان طولانی برای تولید ارقام مقاوم، این موضوع را تشدید می‌کنند. ارقام مقاوم می‌توانند نقش مهمی در کاهش وابستگی به روش‌های شیمیایی و افزایش پایداری سیستم‌های کشاورزی را ایفا کنند (Kennelly et al., 2007). همچنین، ارقام مقاوم می‌توانند موجب افزایش مقاومت گیاهان به شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، شوری، و بیماری‌های مختلف شوند، که این امر بهبود کارایی تولید و افزایش عملکرد در کشاورزی را ایجاد می‌کند. از این رو، توسعه و ارتقاء تولید ارقام مقاوم به بیماری‌ها، یکی از راهکارهای موثر در جهت ارتقای بهره‌وری و پایداری سیستم‌های کشاورزی است. به دلیل اهمیت این بیماری بررسی مقاومت برخی از ارقام رایج هلو در کشور ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش

نمونه برداری و جداسازی

از درختان میوه‌ی هسته‌دار در سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، نمونه‌های دارای نشانه‌های بیماری به خصوص شاخه و برگ‌های آلوده جمع‌آوری و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی بیمارگر، بافت‌های آلوده سه بار با آب معمولی شستشو شده و قطعات دارای علائم به پتری سترون منتقل و به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه برای برگ و ۶۰ تا ۹۰ ثانیه برای بافت‌های چوبی با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ تا ۱۰ درصد به صورت سطحی ضد عفونی سطحی و از آنها عصاره گیری انجام گرفت و روی محیط کشت نویترینت آگار (NA) به صورت مخطط کشت گردید. بعد از ۴۸ ساعت پرگنه‌های رشد یافته در پتری‌ها جداسازی و خالص‌سازی شدند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

برای بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استاندار نظیر تست گرم، اکسیداز، کاتالاز، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت کینگ ب (KB)، رشد بی‌هوازی، لوان، هیدرولیز نشاسته و آسکولین، تولید آرژنین دهیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی توتون انجام پذیرفت (Schaad et al., 2001).

شناسایی ژنوتیپی جدایه‌ها

شناسایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *syrB* و *syrD*

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها از جفت اغازگر B1 و B2 برای تکثیر ژن *syrB* و D1 و D2 برای ردیابی ژن *syrD* استفاده شد (Sorensen et al., 1998). ترادف این آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

چرخه‌های دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR در جدول ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه برای ردیابی جدایه‌ها

Table 1. Primers used in this study to detect isolates

Gene	Forward primer	Reverse primer
syrB	5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'	5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'
syrD	5'- CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC- 3'	5'- TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC- 3'

جدول ۲- چرخه‌ی دمایی استفاده شده در واکنش PCR برای آغازگرهای B1/ B2

Table 2. Temperature cycle used in PCR reaction for primers B1/B2

	Temperature (°C)	Number of cycles	Time (min)
Initial denaturation	94	1	5
Denaturation	94	35	1.5
Annealing	60	35	1.5
Elongation	72	35	5
Final extension	72	1	10

جدول ۳- چرخه‌ی دمایی استفاده شده در واکنش PCR برای آغازگرهای D1/ D2

Table 3. Temperature cycle used in PCR reaction for primers B1/B2

	Temperature (°C)	Number of cycles	Time (min)
Initial denaturation	93	1	3
Denaturation	93	36	1
Annealing	60	36	1
Elongation	72	36	1
Final extension	72	1	6

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها و مقاومت ارقام هلو

برای بررسی مقاومت ارقام هلو، جدایه بیمارگر *Pss* به نهال‌های دو ساله ارقام مختلف هلو شامل زعفرانی (*Prunus persica* L. cv. Zaafarani)، آلبرتا (*Prunus persica* Batsch var. Elberta)، انجیری (*Prunus persica* var. Platycarpa) و هسته جدا (*Prunus persica* var. Redhaven) مایه‌زنی شدند. خاک مورد استفاده از سه قسمت مساوی خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی بود که در کیسه‌های نشاء کوچک با دستگاه اتوکلاو استریل گردید و برای بازسازی بافت خاک به مدت یک ماه در گلخانه نگه‌داری شدند. نهال‌ها در گلدان‌های هم‌اندازه و هم شکل ۱۰ کیلوگرمی کاشته شدند و در شرایط گلخانه نگه‌داری شدند. از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت NA، سوسپانسیونی به غلظت 10^7 cfu/ml در آب مقطر استریل تهیه و با استفاده از سرنگ به ساقه و شاخه (مجاور جوانه) نهال‌های هلو تزریق شد. برای حفظ رطوبت، گیاهان به طور کامل زیر پلاستیک قرار گرفتند. برگ‌های گیاهان مورد آزمایش توسط جدایه *Pss* مایه‌زنی شدند. ابتدا سطح برگ‌ها به وسیله پودر کاربوراندوم خراش داده شده و سپس سوسپانسیون باکتری روی سطح برگ اسپری گردید. ظهور علائم و نحوه پیشرفت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد شانکر درساقه و شاخه، میزان پیشرفت شانکر، ایجاد نواحی نکروتیک زیر ناحیه شانکر و تعداد لکه‌های کلروتیک و نکروتیک در برگ از معیارهای مورد استفاده برای ارزیابی مقاومت در نظر گرفته شد.در تیمار شاهد باکتری *Pseudomonas fluorescens* به گیاهان مایه‌زنی گردید.

بررسی ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های مختلف

آماده‌سازی DNA

پرگنه‌های کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی، به لوله‌های حاوی ۰/۸۵ درصد محلول نمک سترون منتقل و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل در محلول نمک حل شد

و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. از فاز رویی مستقیما در PCR استفاده گردید (Little et al., 1998).

ردیابی ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های مختلف *Pss*

به منظور ردیابی ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های مختلف *Pss* از ۷ جفت آغازگر استفاده گردید. خصوصیات آغازگرها و مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR و چرخه دمایی لازم در جدول ۴ آورده شده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD صورت پذیرفت. همچنین از باکتری *P. fluorescens* به عنوان جدایه غیربیماری‌زا نیز در این مطالعه استفاده گردید.

الکتروفورز محصول PCR

برای بررسی قطعات تکثیر شده در آزمون PCR، ژل آگارز یک درصد (یک گرم آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE شامل ۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید و ۰/۷۳ گرم EDTA تهیه گردید. مقدار ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری شامل بروموفنول بلو ۰/۲۵ درصد و گلیسرول ۳۰ درصد مخلوط و در چاهک‌های ژل قرار گرفتند. پس از پایان الکتروفورز استفاده از دستگاه Gel Documentation از ژل عکسبرداری انجام گرفت.

نتایج

جداسازی عامل بیماری

از درختان آلوده که علائم بیماری را نشان می‌دادند، جدایه‌های گرم منفی با پرگنه‌ی محدب و کرم رنگ روی محیط کشت NA جداسازی گردید. پس از خالص‌سازی، جدایه‌های گرم منفی، اکسیداز منفی، آرژنین دهیدرولاز منفی، عدم توانایی در لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی و دارای توانایی القای واکنش فوق حساسیت روی توتون، برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. نام جدایه‌ها و محل جمع آوری آن‌ها در جدول ۵ ذکر گردیده است. بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی تمام جدایه‌های مورد بررسی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها در جدول ۶ قابل مشاهده می‌باشد. تمام جدایه‌ها، گرم منفی و کاتالاز مثبت بودند. توانایی رشد بی‌هوازی را نداشتند و روی محیط کشت YDC تولید رنگدانه زرد نکردند. آزمون‌های هیدرولیز آسکولین، هیدرولیز ژلاتین و تولید لوان در تمام جدایه‌ها مثبت بود.

جدول ٤- ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Table 4. The characteristics of the primers used to detect virulence genes in different isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Target gene	Primer	Sequence	Expected fragment size (bp)	Annealing temperature
Syringomycin (*syrB*)	B1 B2	5' CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG 3' 5' TCGATTTTGCCGTGATGAGTC 3'	757	60
Syringomycin (*syrD*)	D1 D2	5' AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG 3' 5' GGCAATACCGAACAGGAACAC 3'	446	57
Syringopeptin (*sypA*)	sypA1 sypA2	5' TGCGGGTCGAGGCGTTTTTG 3' 5' GTTGCCGCGTCCTTGTCTGA 3'	248	59
Syringopeptin (*sypB*)	sypB1 sypB2	5' TTCGATCAGGGTCACCGCCAACAATG 3' 5' AGCTGCTCAATGTCGAAAAGGTC 3'	186	62
Nitrilase (*Nit*)	Nit1 Nit2	5'CGTCAGGAAAGCTCATAG 3' 5'TCAGGAATCGCTGAGTG 3'	1085	52
Achromobactin (*Ach*)	Ach1 Ach2	5' ATGAACTTCACTTCACTCGCC 3' 5' CGGGGTTCGGTCAGGT 3'	1894	55
Effector (*hrmA*)	hrmA1 hrmA2	5'GTGAACCCTATCCATGCA 3' 5'TCAGTTTCGCGCCCTGAG 3'	1128	56
16SrRNA	PsF PsR	5'TTGGCTAGGTATCGCTATGG 3' 5' AGGACCCAGTTTTGGAGTGC 3'	600	52

Pseudomonas syringae* pv. *syringae

جدول ۵- مشخصات جدایه‌های مختلف *Pss* جداشده از میزبان‌های مختلف در استان کهگیلویه و بویر احمد

Table 5. Characteristics of different *Pss* strains isolated from different hosts in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province

Isolate	Plant part	Symptoms	Sampling location	Host
G1	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Margoon	Cherry
G2	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Sepidar	Cherry
H1	Leaf	Necrotic spots with chlorotic halos	Yasouj	Peach
H2	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Yasouj	Peach
H3	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Yasouj	Peach
H4	Leaf	Necrotic Spots with chlorotic halos	Tange-sorkh	Peach
H5	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Sisakht	Peach
B1	Leaf	Necrotic Spots with chlorotic halos	Kakan	Almond
Z1	Branch	Canker, Brown tissue and Gummosis	Margoon	Apricot

جدول ٦- خصوصیات فنوتیپی سویه‌های جداسازی شده از درختان هسته‌دار

Table 6. Phenotypic characteristics of strains isolated from stone fruit trees

Isolate									Test
G1	G2	H1	H2	H3	H4	H5	B1	Z1	
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Gram
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Oxidase
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Catalase
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Fluorescent pigment on KB
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Yellow pigment on YDC
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Aerobic growth
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Anaerobic growth
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Levan production
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gelatin hydrolysis
−	−	−	−	−	−	−	−	−	Arginine dihydrolase
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Aesculin hydrolysis
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tobacco HR on tobacco

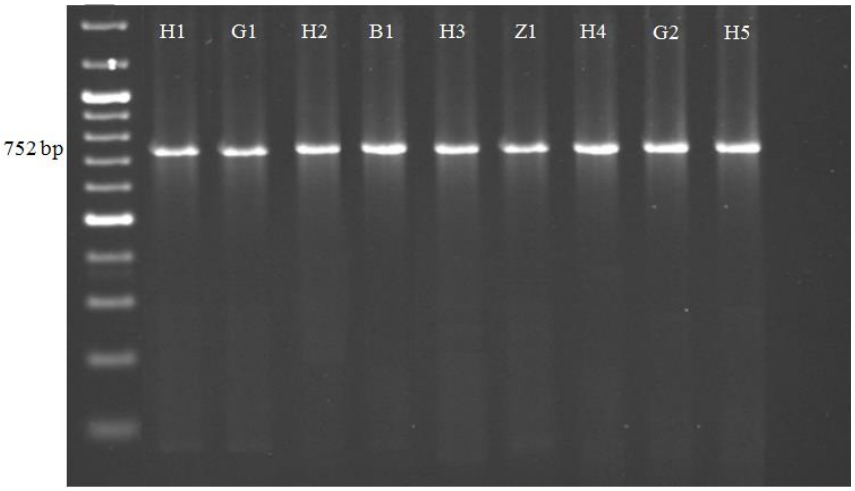
ردیابی باکتری عامل شانکر هسته‌داران با آغازگرهای اختصاصی

ژن *syrB* (تولید زهرابه‌ی سیرینگومایسین) در جدایه‌های مورد آزمایش ردیابی شد (شکل ۱). در جدایه‌های مورد بررسی قطعه‌ی ۷۵۲ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی B1 و B2، تکثیر گردید. با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی D1 و D2 قطعه ۱۰۴۰ جفت بازی در جدایه‌های مورد بررسی ردیابی گردید (شکل ۲).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها و مقاومت ارقام هلو

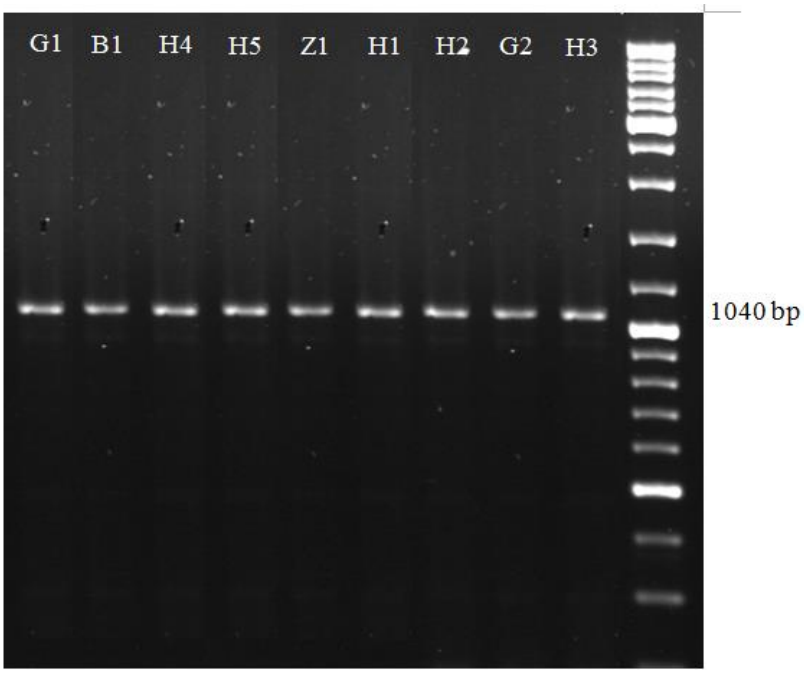
در آزمون بیماری‌زایی و بررسی پرآزاری، شش جدایه *Pss* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مربوط به بیماری‌زایی جدایه‌ها در جدول ۷ نمایش داده شده است. علائم شدید به صورت تشکیل لکه‌های پیشرفته به تعداد زیاد در برگ‌ها، ایجاد شانکر پیشرفته، قهوه‌ای شدن چوب در زیر محل شانکر و ترشح صمغ در ساقه گیاهان مایه‌زنی شده، در نظر گرفته شد. علائم خفیف بیماری به صورت ایجاد لکه‌های کوچک و کم در

ایجاد نواحی نکروتیک کوچک با پیشرفت کم در ساقه در نظر گرفته شد. تمام جدایه‌ها ولی با شدت‌های متفاوت توانایی ایجاد علائم بیماری را در نهال‌های هلو داشتند (شکل ۳). پرآزارترین جدایه‌ها در رقم انجیری، H1، H2، H3، H4، H5 و G1 بودند. این جدایه‌ها ایجاد شانکر گسترده در این رقم کردند. برگ‌های آلوده هلو دارای لکه‌های قهوه‌ای، برنزه و معمولا با هاله زرد رنگ بودند. نواحی بافت مرده در نهایت فرو می‌ریختند و به برگ ظاهری غربالی می‌دادند.



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B1 و B2 تکثیر کننده ژن *syrB* در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

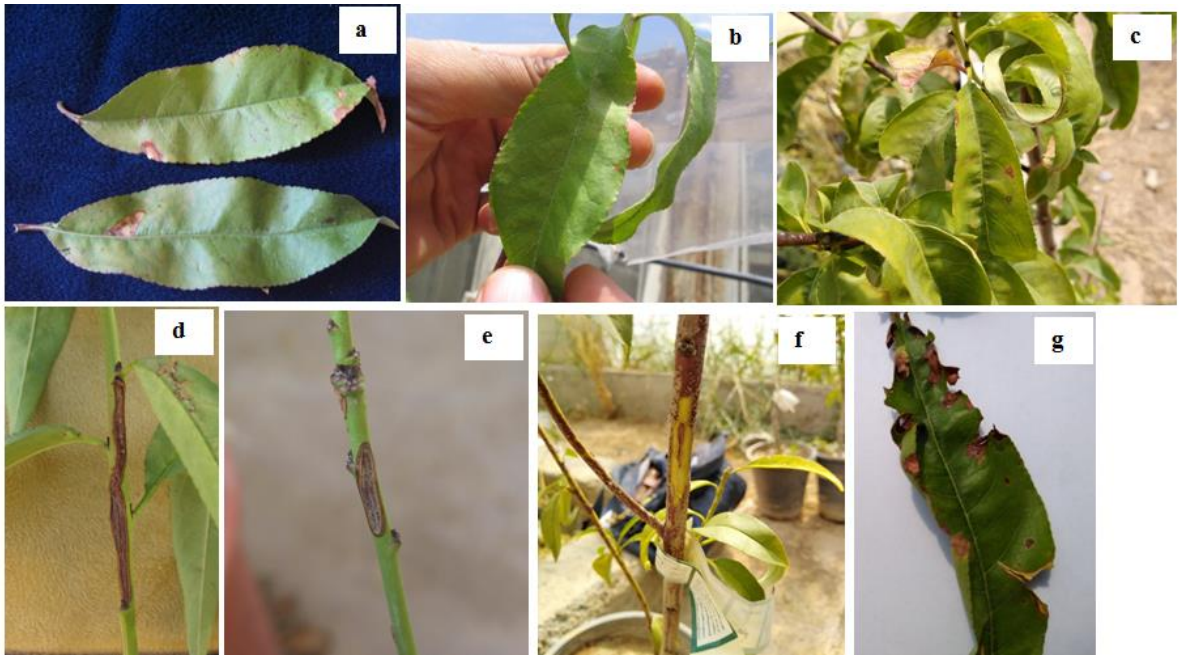
Figure 1. Electrophoresis patterns of the PCR product using specific primers B1 and B2 amplifying the *syrB* gene in different isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی D1 و D2 تکثیر کننده ژن *syrD* در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Figure 2. Electrophoresis patterns of the PCR product using specific primers D1 and D2 amplifying the *syrD* gene in different isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

برگ‌ها و تمام جدایه‌ها در نواحی مایه‌زنی شده ساقه ایجاد نواحی نکروتیک کردند. در آلودگی شدید در محل مایه‌زنی شده ترشح صمغ نیز مشاهده گردید. نواحی ساقه و برگ گیاهان هلو که با باکتری‌های *P. fluorescens* مایه‌زنی شده بودند هیچ گونه علائم بیماری را نشان ندادند. تمام جدایه‌های مورد آزمایش علائم شدید بیماری (تشکیل لکه‌های پیشرفته به تعداد زیاد در برگ‌ها، ایجاد شانکر پیشرفته و قهوه‌ای شدن چوب در زیر محل شانکر) را در رقم انجیری ایجاد کردند. در حالیکه این جدایه‌ها علائم خفیف بیماری را (ایجاد لکه‌های کوچک و کم در برگ‌ها و ایجاد نواحی نکروتیک با پیشرفت محدود در ساقه) در رقم هسته‌جدا ایجاد نمودند. از بین جدایه‌های مورد آزمایش فقط جدایه‌های H4 و H5 در رقم آلبرتا به شدت بیماری‌زا بودند و علائم شدید بیماری را در برگ‌ها و ساقه‌های مایه‌زنی شده تولید کردند و سایر جدایه‌ها علائم خفیف را ایجاد نمودند. همچنین از بین جدایه‌های مورد آزمایش فقط جدایه‌های H4، H5 و H2 در رقم زعفرانی علائم شدید بیماری را القا کردند و سایر جدایه‌ها علائم خفیف را ایجاد نمودند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که رقم هسته‌جدا در برابر جدایه‌های مختلف باکتری عامل شانکر هسته‌داران دارای مقاومت بالاتری است. همچنین رقم انجیری از حساسیت بالایی نسبت به بیماری شانکر هسته‌داران برخوردار است. ارقام آلبرتا و زعفرانی به عنوان ارقام نیمه مقاوم معرفی می‌گردند.



شکل ۳ - بیماری‌زایی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در ارقام مختلف هلو: (a) علائم بافت مردگی در برگ هلو رقم زعفرانی مایه‌زنی شده با جدایه H3، (b) علائم بافت مردگی در برگ هلو رقم هسته جدا مایه‌زنی شده با جدایه H1، (c) علائم بافت مردگی در برگ هلو رقم هسته جدا مایه‌زنی شده با جدایه H4، (d) علائم شانکر و بافت مردگی در ساقه هلو رقم انجیری مایه‌زنی شده با جدایه H1، (e) علائم شانکر و بافت مردگی در ساقه هلو رقم آلبرتا مایه‌زنی شده با جدایه H1، (f) علائم شانکر و بافت مردگی در ساقه هلو رقم هسته جدا مایه‌زنی شده با جدایه H4، (g) علائم بافت مردگی در برگ هلو رقم انجیری جدا مایه‌زنی شده با جدایه H4.

Figure 3. Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates in different peach cultivars: (a) Symptoms of necrosis in peach leaves of Zaferani variety inoculated with H3 strain, (b) Symptoms of necrosis in peach leaves of Hastejoda variety inoculated with H3 strain, (c) Symptoms of necrosis in peach leaves of Hastejoda variety inoculated with H4 strain, (d) Symptoms of canker and necrosis in the peach stem of Anjiri variety inoculated with H1 strain, (e) Symptoms of canker and necrosis in the peach stem of Alberta variety inoculated with H1 strain, (f) Symptoms of canker and necrosis in the peach stem of Hastejoda variety inoculated with H4 strain, (g) Symptoms of necrosis in peach leaves of Anjiri variety inoculated with H4 strain.

جدول ۷- واکنش ارقام هلو به جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Table 7. Response of peach varieties to various isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Isolate	Host	Anjiri	Zaferani	Alberta	Hastejoda
H1	**Peach**	+++	+	+	+
H2	**Peach**	+++	+++	+	+
H3	**Peach**	+++	+	+	+
H4	**Peach**	+++	+++	+++	+
H5	**Peach**	+++	+++	+++	+
G1	**Cherry**	+++	+	+	+
P. fluorescens	–	–	–	–	–

+: Small spots with a limited number on the leaves and necrotic areas with limited progress in the stem
+++: Advanced spots in large numbers on leaves, developing advanced canker, browning of wood under the canker
– : No symptoms

ردیابی ژن‌های دخیل در پرآزاری

ژن‌های دخیل در پرآزاری جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در جدایه‌های مختلف ردیابی گردید (جدول ۷). ژن مسئول تولید زهرابه سیرینگومایسین (*syrB*) در تمام جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه ردیابی شد. در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B_1 و B_2، قطعه قابل انتظار ۷۵۷ جفت بازی در تمام جدایه‌های *Pss* تکثیر شد (جدول ۸). ژن مسئول ترشح زهرابه سیرینگومایسین (*syrD*) نیز در تمام جدایه‌ها ردیابی شد و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی D_1 و D_2 قطعه ۴۴۶ جفت بازی در این جدایه‌ها تکثیر گردید. ولی این ژن در جدایه‌های *P. fluorescens* ردیابی نشد. ژن *sypA* مسئول تولید زهرابه سیرینگوپپتین، در جدایه‌های H2، H3، H4 و H5 ردیابی شد و قطعه مورد انتظار ۲۴۸ جفت بازی توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *sypA* تکثیر گردید. این ژن در جدایه‌های H1 و G1 ردیابی نشد. در جدایه‌های H2، H4، H5 و G1 ژن *sypB* که در تولید زهرابه سیرینگوپپتین نقش دارد، ردیابی گردید. بعد از تکثیر این ژن با آغازگرهای $SypB_1$ و $SypB_2$ قطعه مورد نظر ۱۸۶ جفت بازی در این جدایه‌ها تکثیر شد. این قطعه در جدایه‌های H1، H3 و *P. fluorescens* ردیابی نگردید. در جدایه‌های H4 و H5 ژن *nit* مسئول تولید آنزیم نیتریلاز، ردیابی شد و قطعه مورد انتظار ۱۰۸۵جفت بازی پس از تکثیر ژن با آغازگرهای اختصاصی nit_1 و nit_2 تکثیر شد. این ژن در سایر جدایه‌ها ردیابی نشد. ژن تولید کننده سیدروفور اکروموباکتین (*Ach*) در جدایه‌های H1، H2 و H4 ردیابی شد. قطعه مورد انتظار پس از تکثیر ژن با آغازگرهای اختصاصی ژن اکروموباکتین ۱۸۹۴ جفت باز بود (جدول ۸). به نظر می‌رسد سایر جدایه‌ها فاقد این ژن باشند. جدایه‌های H3، H4 و H5 در آزمون تشخیصی PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی $hrmA_1$ و $hrmA_2$، یک قطعه DNA با اندازه تقریبی ۱۱۲۸ جفت باز را تکثیر کردند. سایر جدایه‌ها و گونه *P. fluorescens* قادر به تکثیر این قطعه نبودند.

بحث

بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار در استان کهگیلویه و بویراحمد که جزو مناطق اصلی پرورش این درختان می‌باشد به شدت شیوع داشته و خسارات قابل ملاحظه‌ای به درختان و میزان بارآوری آن‌ها وارد می‌سازد. این بیماری در بسیاری از موارد طی دو یا چند سال درختان را بطور کامل از شرایط تولید اقتصادی خارج می‌سازد. شغل اصلی مردم این مناطق کشاورزی و باغداری است و اقتصاد بسیاری از خانواده‌های روستایی به این موضوع متکی می‌باشد. همچنین این افراد توانایی مالی مورد نیاز جهت اعمال سایر روش‌های مدیریت باغ را ندارند، لذا لازم است راهکارهای مناسبی اتخاذ شود تا از لحاظ اقتصادی کشت و تولید این محصولات برای باغداران به صرفه باشد.

جدول ۸- ردیابی ژن‌های پرآزاری در جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از میزبان‌های مختلف

Table 8. Detection of virulence genes in isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from different hosts

Isolate	Host	*syrB*	*syrD*	*sypA*	*sypB*	*nit*	*Ach*	*hrmA*
H1	**Peach**	+	+	−	−	−	+	−
H2	**Peach**	+	+	+	+	−	+	−
H3	**Peach**	+	+	+	−	−	−	+
H4	**Peach**	+	+	+	+	+	+	+
H5	**Peach**	+	+	+	+	+	−	+
G1	**Cherry**	+	+	−	+	−	−	−
Pseudomonas fluorescens CHAO		−	−	−	−	−	−	−

+: Amplification of the target gene in PCR
-: No amplification of the target gene in PCR

شناسایی ارقام مقاوم به این بیماری (موضوع تحقیق حاضر) راهکار مناسبی (با کمترین هزینه) برای جلوگیری از ایجاد خسارت و کنترل بیماری شانکر هسته‌داران محسوب می‌شود (Kennelly et al., 2007). نظر به سرعت در خور توجه انتقال و سرایت بیماری از درختان آلوده به سالم لزوم بررسی دقیق بیماری، شناسایی علت یا عوامل دخیل در بیماری و نهایتاً کنترل و مدیریت بیماری کاملا واضح می باشد. بر این اساس و بدلیل اهمیت درختان هسته‌دار در کشور و بروز علایم حاد بیماری مذکور، پروژه تحقیقاتی مذکور برای بررسی مقاومت ارقام رایج در منطقه نسبت به این بیماری طراحی گردید. در این تحقیق از برگ، شاخه و ساقه گیاهان آلوده از مناطق جغرافیایی مختلف جدایه‌های متعددی جداسازی گردید که همگی آن‌ها گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و هوازی اجباری بوده و روی محیط کشت KB توانایی تولید رنگدانه فلورسنت را دارا بودند. بر اساس آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی جدایه‌های انتخابی به عنوان گونه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* تشخیص داده شدند (Schaad et al., 2001). تولید سیرینگومایسین منحصر به جدایه‌های *Pss* بوده و توسط سودوموناس‌های دیگر گزارش نشده است (Bultreys & Gheysen, 1999). در تحقیق حاضر تمام جدایه‌ها قطعه‌ی ۱۰۴۰ جفت بازی مربوط به ژن *syrD* را با استفاده از این آغازگرهای اختصاصی تکثیر نمودند. به عبارتی ژن‌های *syrB* و *syrD* در تمام جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق ردیابی شدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در بین ارقام هلو مورد آزمایش، رقم هسته‌جدا در برابر جدایه‌های مختلف باکتری عامل شانکر هسته‌داران از مقاومت بالایی برخوردار است. همچنین رقم انجیری به عنوان رقم حساس به بیماری شانکر هسته‌داران و ارقام آلبرتا و زعفرانی به عنوان ارقام نیمه مقاوم معرفی می‌گردند. مقاومت ارقام مختلف هلو از نظر حساسیت به بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران در استان مازندران مورد بررسی قرار گرفته است (Ghadamnan et al., 2014). نتایج حاصله نشان داد که میزان حساسیت ارقام مورد بررسی نسبت به این بیماری متفاوت است. بر اساس یافته‌های تحقیق آنها، ارقام هلو از نظر حساسیت به شانکر باکتریایی و ظهور علایم اختلاف معنی دار داشته و رقم آلبرتا مقاومت بالاتری نشان داد و رقم زعفرانی و ردتاپ به عنوان ارقام نیمه مقاوم ارزیابی شدند. در تحقیقی دیگر در استان چهارمحال و بختیاری، ارزیابی مقاومت پنج ژنوتیپ هلوی تجاری و بومی منطقه شامل ارقام کاردی دیررس، هسته جدا پیش‌رس، Red Top، J.H.hale و هلوی بلخی پویا نسبت به بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس برخی شاخص‌های بیماری‌زایی نظیر ناحیه بافت‌مرده شاخه، ارقام Red Top، J.H.hale و کاردی دیررس حساسترین ارقام معرفی شدند. همچنین هسته جدا پیش‌رس، به عنوان مقاوم‌ترین رقم گزارش گردید (Maleki et al., 2018). در تحقیقی دیگر، مقاومت ارقام مختلف گیلاس از نظر واکنش به بیماری شانکر هسته‌داران مورد ارزیابی قرار گرفت. میان ارقام مختلف از

نظر حساسیت به شانکر باکتریایی هسته‌داران اختلاف معنی‌داری وجود داشت و برخی از ارقام مقاومت بالا و برخی دیگر به بیماری حساس بودند، ولی هیچ‌کدام از ارقام نسبت به بیماری کاملاً مقاوم نبودند (Hamzehnezhad et al., 2006). در مطالعه‌ای عکس‌العمل ارقام مختلف هلو نسبت به عامل بیماری شانکر هسته‌داران مورد بررسی قرار گرفت و ارقام اسپرینگ کرست (Spring Crest) و ارلی‌گلو (Early Glu) متحمل‌ترین ارقام معرفی گردیدند (Nasrollanejad et al., 2007). زهرابه Syringomycin در پرآزاری جدایه‌های *Pss* نقش اساسی دارد و در اکثر جدایه‌های بیمارگر *Pss* تولید می‌گردد. تولید سیرینگومایسین منحصر به *Pss* بوده و توسط سودوموناس‌های دیگر گزارش نشده است. گراس و دی‌وی (Gross & De Vay,1977) عنوان کردند که اغلب جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* زهرابه سیرینگومایسین تولید می‌کنند. این ژن در میان جدایه‌های مختلف حفاظت شده است. در تمام جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه در این تحقیق ژن‌های *syrB* و *syrD* که در تولید سیرینگومایسین نقش دارند، ردیابی شد. ژن‌های ناحیه *syr* در کروموزوم باکتری *Pss* نقش مهمی در تولید زهرابه سیرینگومایسین دارند (Zhang et al., 1995; Erfani-Nik, 2016). مشخص شده است که علاوه بر ژن *syrD*، ژن‌های *pseA*، *pseB*، *sypD*، *pseC* و ORF_{21} نیز در ژنوم *Pss* نقش انتقال زهرابه‌های باکتری را به خارج از غشای سیتوپلاسمی دارند (Omrani et al., 2019). همچنین سه ژن *sypA*، *sypB* و *sypC* موجود روی کروموزوم باکتری *Pss* در تولید زهرابه سیرینگوپپتین نقش دارند (Wang et al., 2006). این سه ژن ناحیه ۷۳/۸ کیلوبازی را در کلاستر ژنی *syp* اشغال می‌کنند و تولید سه آنزیم تولید کننده سیرینگوپپتین می‌کنند (Scholz-Schroeder et al., 2003). در تحقیق حاضر ژن *sypA* در جدایه‌های H1 و G1 ردیابی نشد. در سایر این جدایه‌ها این ژن ردیابی شد. در حالی که ژن *sypB* در جدایه‌های H1 و H3 ردیابی نشد و در سایر جدایه‌ها ژن *sypB* ردیابی شد. این ژن‌ها در گونه *P. fluoresens* CHAO ردیابی نگردید. این موضوع نشان می‌دهد که ژن‌های مسئول تولید زهرابه سیرینگوپپتین فقط در پاتووار *Pss* وجود دارند. در پژوهشی (Scholz-Schroeder, 2003) مشخص شده است که موتانت *syrB1* باکتری *Pss* به میزان ۲۳ درصد در پرآزاری کاهش نشان می‌دهد در حالی که موتانت *sypA*، ۵۹ درصد کاهش در بیماری‌زایی در مقایسه با تیپ وحشی *Pss* نشان می‌دهد. موتانت *syrB1-sypA* باکتری *Pss* در مقایسه با تیپ اصلی ۷۶ درصد کاهش پرآزاری نشان داده است. این موضوع نشان می‌دهد که به غیر از این ژن‌ها فاکتورهای دیگری نیز در بیماری‌زایی *Pss* نقش دارد. همچنین برخی از موتانت‌های *Pss* که در محیط مصنوعی سیرینگوپپتین تولید نمی‌کنند کماکان درجات مختلفی از علائم را در گیاه ایجاد می‌کنند. ژن *nit* که آنزیم نیتریلاز را در *Pss* کد می‌کند فقط در دو جدایه H4 و H5 ردیابی گردید. آنزیم نیتریلاز در هیدرولیز ترکیبات نیتریلی به کربوکسیلیک اسید و آمونیوم نقش دارد و باکتری‌ها نیتریلازها را برای سم زدایی نیتریل به کار می‌برند. مهم‌ترین نقش نیتریلازهای *Pss* القای مقاومت در برابر متابولیت‌های ثانویه گیاهی و همچنین تولید اکسین می‌باشد (Howden et al., 2009). مطالعات قبلی نشان داده است که آنزیم نیتریلاز در بسیاری از جدایه‌های *P. syringae* وجود ندارد (Sarkar & Guttman, 2004). ایندول استیک اسید یک فاکتور مهم بیماری‌زایی و پرآزاری در بسیاری از بیمارگرها می‌باشد و آن‌ها را قادر می‌سازد که به سازوکارهای دفاعی گیاه فائق آیند و بتوانند گیاه را به راحتی کلونیزه کنند (Spoel & Dong, 2008). به نظر می‌رسد که نقش اصلی آنزیم‌های نیتریلاز تولید ایندول استیک اسید نمی‌باشد و در واقع نقش مهم آن‌ها متابولیزه کردن نیتریل‌های سمی و تبدیل آن‌ها به اسید کاربوکسیلیک غیرسمی می‌باشد. بنابراین اهمیت آنزیم نیتریلاز به میزان و طبیعت مواد شیمیایی تولیدی توسط گیاه میزبان بستگی دارد (Vetter, 2000). سویه B728a باکتری *Pss* حداقل دارای یکی از سیدروفورهای پایووردین و آکروموباکتین می‌باشد در واقع آنالیز ژنوم این باکتری نشان داده است که یک کلاستر ژنی با شباهت بسیار بالا با کلاستر ژنی کد کننده آکروموباکتین باکتری *Dickeya chrysanthemii* در سویه B728a وجود دارد

(Feil et al., 2005). در تحقیق حاضر ژن کد کننده سیدروفور آکروموباکتین فقط در جدایه‌های H1، H2 و H4 ردیابی گردید. در سایر جدایه‌ها این ژن ردیابی نشد. سیدروفور پایووردین که به وسیله *Pss* تولید می‌شود نقش مهمی در جذب آهن طی بیماری‌زایی باکتری دارد. این نقش از طریق تامین آهن مورد نیاز باکتری به منظور استقرار و توسعه بیماری تامین می‌شود زیرا آهن در تولید سیرینگومایسین در گیاه نقش دارد (Berti & Thomas, 2009). باکتری مهاجم باید به طور دائم از منابع گیاهی مختلف آهن مورد نیاز خود را تامین کند تا در روند تولید سیرینگومایسین و بیماری‌زایی آن اختلالی ایجاد نشود. ژن‌های *hrp* سویه ۶۱ باکتری *Pss* که بیمارگر لوبیا می‌باشد در یک ناحیه ۲۵ کیلوبازی در ژنوم واقع شده‌اند. همچنین، ژن‌گاه *hrmA* برای القای واکنش فوق حساسیت در گیاه توتون مورد نیاز می‌باشد (Huang et al., 1993). زمانی که این ژن از سویه ۶۱ به باکتری *P. fluorecense* منتقل شد این باکتری توانست واکنش فوق حساسیت را در گیاه توتون القا کند. این ژن در بسیاری از *Pss*های مورد آزمایش ردیابی نشده است. در بسیاری از جدایه‌های *Pss* فاقد این ژن، واکنش فوق حساسیت در گیاه القا می‌شود بنابراین در این جدایه‌ها نیازی به ژن *hrmA* نمی‌باشد (Huang *et al*., 1993). در تحقیق حاضر ژن *hrmA* در جدایه‌های H3، H4 و H5 ردیابی شد. در سایر جدایه‌های مورد مطالعه این ژن ردیابی نشد. برخی مطالعات نشان داده است که ژن *hrmA* ممکن است در محدود کردن دامنه میزبانی باکتری نقش داده باشد و به عنوان یک ژن *avr* عمل کند. تاثیر ژن *hrmA* روی فنوتیپ باکتری *E. coli* و همچنین گستردگی محدود این ژن در بین جدایه‌های *P. syringae* نشان می‌دهد که احتمالا این ژن در تعیین دامنه میزبانی باکتری نقش دارد (Huang et al., 1993). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ژن‌های بسیاری در بیماری‌زایی *Pss* نقش دارند. هرچه تعداد ژن‌های پر آزاری بیشتر باشد شدت بیماری ایجاد شده توسط بیمارگر نیز بیشتر است.

سپاس‌گزاری

پروژه حاضر در قالب طرح پژوهشی مشترک سازمان جهاد کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد و دانشگاه یاسوج به شماره ۹۶/۱۰۳۹۹/۱۲ به انجام رسیده است. از حمایت‌های مالی و امکانات فراهم شده جهت اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Berti, A. D., & Thomas, M. G. (2009). Analysis of Achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of Bacteriology*, *191*(14), 4594-4604.

Bultreys, A., & Gheysen, I. (1999). Biological and molecular detection of toxic Lipodepsipeptide- producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(5), 1904-1909.

Erfani-Nik, M. (2016). Evaluation of resistance in some cherry cultivars to bacterial canker of stone fruits in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province and detection of pathogenicity genes in these isolates. Yasouj University, Iran.

FAO. 2023. The State of Food and Agriculture (2023). Overcoming water challenges in agriculture. Rome. https://doi.org/10.4060/cb1447en.

Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J. E., Lapidus, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Kyrpides, N. C., Ivanova, N. & Lindow, S. E. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceeding of National Academy Sciences of USA*, *102*, 11064–11069.

Gasic, K., Prokic, A., Ivanovic, M., Kuzmanovic, N., & Obradovic, A. (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine* (Belgrade), *27*(3), 219–229.

Ghadamnan, F., Aldaghi, M., & Ghasemi, A. (2014) Evaluation of the resistance of peach and nectarine cultivars to *Pseudomonas syringae*, in Mazandaran province. Paper presented at the 2nd National conference on medicinal plants and sustainable agriculture. 23 August Hamadan, Iran.

Gilbert, V., Planchon, V., Legras, F., Maraite, H., Bultreys, A. (2010). Pathogenicity and aggressiveness in populations of *P. syringae* from Belgian fruit orchards. *European Journal of Plant Pathology, 126*, 263-277.

González, A. J., Rodicio, M. R., & Mendoza, M. C. (2003). Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 2936-2941.

Gross, D. C., & De Vay, J. E. (1977). Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiological Plant Pathology, 11*, 13-28.

Hamzehnezhad, P., Ghasemi, A., Rahimian, H., & Goharkhani, S. (2006). Evaluation of resistance of cherry cultivars to *Pseudomonas syringae* the causal agent of canker disease of stone fruit trees. *Iranian Journal of Agriculture Science*, *37*(3), 457-462. (In Persian).

Howden, A. J. M., Rico, A., Mentlak, T., Miguet, L., & Preston, G. M. (2009). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Molecular Plant Pathology, 10*(6), 857- 865.

Huang, H. C., Xiao, Y., Lin, R. H., Lu, Hutcheson, S. W., & Collmer, A. (1993). Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpJ* and *hrpI* genes: Homology of HrpI to a superfamily of proteins associated with protein translocation. *Molecular Plant-Microb Interaction, 6*, 515-520.

Hulin, M. T., Mansfeld, J. W., Brain, P., Xu, X., Jackson, R. W., & Harrison, R. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology, 67*, 1177–1193.

Kaluzna, M., Pulawska, J., & Sobiczewski, P. (2010). The use of PCR melting profile for typing of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruit trees. *European Journal of Plant Pathology, 126*, 437-443.

Kennelly, M. M., Cazorla Francisco, M., de Vicente, A., Ramos, C., & Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease, 91*, 4-17.

Kersters, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., & Schleifer, K. H. (1996). Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology, 19*, 465-477.

Little, E. L., Bostock, R. M., & Kirkpatric, B. C. (1988). Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(10), 3818–3823.

Maleki, A., Motamedi, A., Yosefi Kopaei, F., & Noorbakhsh, H. (2018). Assessment of resistance of peach Varieties to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bacteria causing Stone Fruit Bacterial Canker in Chaharmahal and Bakhtiari province. International conference on promotion of scholar and regional cooperation on food and agricultural Science, Mashhad, Iran.

Marroni, M. V., Casonato, S., Visnovsky, S. B., Pitman, A. R., Beresford, R. M., & Jones, E. E. (2023). Genetic characterization and prevalence of *Pseudomonas syringae* strains from sweet cherry orchards in New Zealand. *Plant Pathology*, *72*(9), 1673-1686.

Nasrollanejad, S., Alishah, A., & Azad, F. (2007). Biochemical detection of bacterial canker of stone fruit. 2nd National Congress of Ecological Agriculture, Gorgan, Iran.

Ogawa, T. M., Zehr, E., Bird, G. W., Ritcher, D. F., Uriu, K., & Uyemoto, J. K. (1995). Compendium of stone fruit tree diseases. American Phytopathology Society Press Paul, Minnesota, USA.

Omrani, M., Roth, M., Roch, G., Blanc, A., Morris, C. E., & Audergon, J. M. (2019). Genome-wide association multi-locus and multi-variate linear mixed models reveal two linked loci with major effects on partial resistance of apricot to bacterial canker. *BMC Plant Biology*, *19*, 1-18.

Rabiey, M., Roy, S. R., Holtappels, D., Franceschetti, L., Quilty, B. J., Creeth, R., Sundin, G. W., Wagemans, J., Lavigne, R., & Jackson, R. W. (2020). Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microbial Biotechnology*, *13*, 1428–1445.

Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 1999–2012.

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathology Society Press. USA.

Scholz-Schroeder, B. K., Soule, J. D., & Gross, D. C. (2003). The *sypA*, *sypB*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the Nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, *16*(4), 271-280.

Sorensen, K.N., Kim, K.H. and Takemoto, J. Y. (1998). PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 226-30.

Spoel, S. H., & Dong, X. N. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe*, *3*, 348-351.

Verhaegen, M., Bergot, T., Liebana, E., Stancanelli, G., Streissl, F., Mingeot-Leclercq, M. P., Mahillon, J., & Bragard, C. (2023). On the Use of Antibiotics to Control Plant Pathogenic Bacteria: A Genetic and Genomic Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1221478.

Vetter, J. (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, *38*, 11–36.

Wang, N., Lu, S., Wang, J., Chen, Z. J., & Gross, D. C. (2006). The expression of genes encoding lipodepsipeptid phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(3), 257-269.

Zhang, J. H., Quigley, N. B., & Gross, D. C. (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.

© 2024 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.