

تعیین خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

حمیده احسنی^۱، جواد محمودی صفا^۱✉، سعید نصراله نژاد^۲، حشمت اله رحیمیان^۳

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته‌های کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران؛ ۳- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸)

چکیده

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (*Pss*) عامل یکی از بیماری‌های شایع در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار می‌باشد. به منظور شناسایی جدایه‌های عامل بیماری، ۲۳ جدایه به دست آمده از باغ‌های درختان میوه هسته‌دار واقع در مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی از نظر فنوتیپی (فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی) و بیماری‌زایی بررسی شد. صحت تشخیص جدایه‌ها در سطح گونه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای D21/D22 اختصاصی گونه تأیید شد. تنوع ژنتیکی جدایه‌ها به دو روش repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) و با استفاده از آغازگرهای BOXA1R، ERIC1R و ERIC2 و روش Insertion Sequence PCR (IS-PCR) و با استفاده از آغازگر IS50 بررسی شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده نشان داد که در BOX-PCR با آغازگر BOXA1R در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه‌ها در ۷ گروه؛ در ERIC-PCR با آغازگر ERIC1R در سطح تشابه ۶۵ درصد، جدایه‌ها در ۷ گروه و با آغازگر ERIC2 در سطح تشابه ۵۶ درصد، جدایه‌ها در ۸ گروه؛ در IS-PCR با آغازگر IS50 در سطح تشابه ۵۲ درصد، جدایه‌ها در ۱۱ گروه و در نهایت با ترکیب هر چهار آغازگر در سطح تشابه ۵۴ درصد جدایه‌ها در ۷ گروه قرار گرفتند. نتایج بیانگر تنوع ژنتیکی بالا درون جدایه‌های عامل بیماری بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، درختان میوه هسته‌دار، شانکر باکتریایی، rep-PCR، IS-PCR.

Determination of Phenotypic Properties and Genetic Diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains Causing Bacterial Canker in Stone Fruits in Razavi and Northern Khorasan Provinces.

H. AHSANI¹, J. MAHMOODI SAFA¹✉, S. NASROLAHNEJAD², H. RAHIMIYAN³

1 and 2, Graduated MSc students and Associate Professor, Dept. Plant Pathology, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran; 3- Professor, Dept. Plant Protection, Sari University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (*Pss*) is the causative agent of the bacterial common diseases in stone fruit trees fields. In this research, samples were collected from various areas in Razavi and Northern Khorasan provinces. A total of 23 bacterial isolates were compared based on their phenotypic (physiological and biochemical) characteristics and pathogenicity tests. Identification of the strains was further confirmed by PCR using D21/D22 primers specific to *P. syringae*. Genetic diversity of selected strains was investigated by repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) fingerprinting using BOXA1R, ERIC1R, ERIC2 primers and Insertion Sequence PCR (IS-PCR) fingerprinting using IS50 primers. The cluster analyses of the fingerprint data showed that in BOX-PCR with BOXA1R primer, 7 groups were developed at a similarity level of 75%. The same numbers of groups were obtained in ERIC-PCR using ERIC1R primer at a similarity level of 65%. In case of ERIC2 primer, at a similarity level of 56%, strains were divided into 8 groups, whereas, in IS-PCR with IS50 primer at a similarity level of 52%, strains were divided into 11 groups and finally by combining all four primers at a similarity level of 54%, strains can be distinguished into 7 groups. The results demonstrated the existence of a considerable genetic diversity among *Pss* strains causing bacterial canker in stone fruit trees in the studied provinces.

Keywords: Bacterial canker, Genetic diversity, Stone fruit trees, rep-PCR, IS-PCR

مقدمه

باکتری *Pseudomonas syringae* Van Hall یک بیمارگر مهم گیاهی است که بیماری‌های ایجاد شده توسط پاتواری‌های این گونه نگرانی عمده در مناطق تولید کننده میوه در سرتاسر دنیا به حساب می‌آیند (Kennelly et al. 2007). باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) می‌تواند در بیش از ۱۸۰ گونه‌ی گیاهی از چندین جنس غیر وابسته به هم بیماری‌زا باشد (Gonzalez et al. 2003) و به درختان هسته‌دار مانند هلو، شلیل، آلو، گیلاس، زردآلو و بادام خسارت قابل توجهی در حد ۱۰-۷۵ درصد بزند و عامل بیماری‌های متعددی روی محصولات زراعی و باغی می‌باشد (Agris, 2005). 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 (Banapur et al. 1989) اشاره کرد.

اعضای متعلق به جنس *Pseudomonas* گرم منفی، میله‌ای یا استوانه‌ای خمیده با ابعاد $1/0-1/5 \times 4/0-4/5$ میکرومتر می‌باشد که سلول‌های آن توانایی حرکت به وسیله یک یا چندین تاژک قطبی را دارند و درصد G+C در DNA آن‌ها ۵۸-۷۱ درصد می‌باشد. این باکتری کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و در گونه *Pseudomonas syringae* اکثر جدایه‌ها بجز جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *persica* روی محیط KB تولید رنگ فلورسنت می‌کنند (Schaad et al. 2001).

مطالعات محققین قبلی حاکی از تشابه زیاد بین جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ الگوی پروتئینی می‌باشد؛ لذا به نظر می‌رسد روش الکتروفورز پروتئین کارایی مناسبی در تمایز جدایه‌های مختلف *Pss* نداشته باشد (Abbasi et al. 2011). بنابراین نیاز به ارزیابی و معرفی روش‌های تشخیص به‌منظور گروه‌بندی دقیق باکتری‌های بیمارگر گیاهی براساس رهیافت‌های مبتنی بر اثر انگشت ژنتیکی وجود دارد (Louws et al. 1999). در حال حاضر دامنه وسیعی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی با

استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس^۱ (PCR) در میزبان‌های متعدد شناسایی شده‌اند (Schaad et al. 2001) و گزارش‌های منتشر شده در ۱۵ سال گذشته روند رو به افزایش کاربرد این روش را در آزمایشگاه‌های تشخیصی نشان می‌دهد و پیش بینی می‌شود در آینده نیز این روند جهت غربال‌گری سریع نمونه‌ها ادامه یابد (Palacio-Bielsa et al. 2009).

در دو دهه اخیر براساس توالی‌های تکرار شونده 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). چهار گروه از توالی‌های تکرار شونده شامل توالی متقارن تکرار شونده خارج ژنی^۲ (REP)، توالی عمومی تکرار شونده بین ژنی درون باکتریایی^۳ (ERIC)، توالی BOX و توالی الحاقی^۴ (IS) روش‌های سریع و ساده‌ای هستند که به‌طور معمول در شناسایی، طبقه‌بندی و بررسی تنوع عوامل شانکر باکتریایی در هسته‌دارها به‌کار می‌روند (Bultreys and Vicent et al. 2004؛ Menard et al. 2003؛ Kaluzna, 2010). با طراحی آغازگرهایی بر اساس توالی‌های تکرار شونده REP، ERIC، BOX و متمم‌هایی تحت عنوان REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR ارائه شده‌اند که به مجموع آن‌ها rep-PCR گفته می‌شود؛ الگوی rep-PCR منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنوم می‌شود و الگوی ژنومی به‌دست آمده از این روش‌ها باعث تولید و تمایز قطعاتی با اندازه‌های مختلف دی‌ان‌ای ژنوم اختصاصی جدایه می‌شود که به عنوان بارکد برای هر جدایه خاص به کار می‌رود (Louws et al. 1994). توالی‌های BOX دارای ۱۵۴ جفت نوکلئوتید می‌باشند که تقریباً ۲۵ بار در ژنوم تکرار می‌شوند و شامل سه زیر واحد ۵۹ نوکلئوتیدی BOXa، ۴۵ نوکلئوتیدی BOXb و ۵۰ نوکلئوتیدی BOXc می‌باشند. توالی‌های BOX در نواحی بین

¹ Polymerase chain reaction

² Repetitive extra genic palindromic

³ Enter bacterial repetitive intragenic consensus

⁴ Insertion sequence

انعطاف‌پذیری ژنوم باکتری‌ها به‌عنوان نشانگرهای دی ان ای استفاده شده‌اند (Mahillon and Chandler, 1998). در روش IS-PCR، توالی الحاقی IS50 از ترانسپوزاز Tn5 به‌عنوان آغازگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در چندین جنس باکتریایی نظیر سودوموناس‌ها استفاده شده است (Weingart and Volksch, 1997; Gilbert et al. 2009).

بررسی تنوع ژنتیکی یک بیمارگر می‌تواند به مطالعه‌ی رده بندی، اپیدمیولوژی و ردیابی آن کمک کند (Milgroom and Fry, 1997) و در برنامه‌های اصلاح نباتات جهت پژوهش در زمینه تولید گونه‌های گیاهی متحمل یا مقاوم به بیماری مفید واقع گردد (Abbasi et al. 2013a). این پژوهش با هدف بررسی خصوصیات فنوتیپی، ارزیابی بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها مختلف *Pss* عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار با استفاده از روش‌های BOX-PCR، ERIC-PCR و IS-PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌ها

در سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۱ از برخی باغ‌های درختان میوه هسته دار و بادام واقع در مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و خراسان شمالی نمونه برداری شد. از درختان دارای علائم لکه‌برگی و شانکر باکتریایی، نمونه‌هایی از بافت‌های آلوده برگ، تنه، شاخه و سرشاخه جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه برای جداسازی باکتری، برگ‌های دارای لکه‌برگی نکروزه و شاخه‌های دارای شانکر ابتدا زیر جریان آب معمولی و سپس دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس از حد فاصل بافت سالم و آلوده برگ و حاشیه شانکر روی شاخه قطعات ۰/۵ سانتی‌متری جدا و در تشتک‌های پتری به وسیله تیغ اسکالپل سترون خرد و چند قطره آب مقطر سترون به آن‌ها اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه، یک لوپ از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی برداشته و روی محیط کشت آگار غذایی دارای ۵ درصد سوکروز (Nutrient Agar

ژنومی قرار گرفته‌اند و توانایی تشکیل ساختار لوپ را داشته و هیچ ارتباطی با توالی‌های ERIC و REP ندارند. توالی‌های BOX اولین بار در ژنوم باکتری‌های گرم منفی کشف شدند که تقریباً ۳۰ تا ۱۵۰ بار در ژنوم باکتری تکرار می‌شوند (Versalovic et al. 1994). توالی‌های ERIC دارای ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت نوکلئوتید با یک توالی معکوس مرکزی حفظ شده، هستند که در نواحی بین ژنومی، ژنوم باکتری‌ها قرار می‌گیرند. این توالی‌ها تقریباً ۳۰ تا ۱۵۰ بار در ژنوم باکتری تکرار می‌شوند (Wolska et al. 2014). در بررسی Najafipour and Taghavi (2011) جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار، گل سرخ و یک جدایه از شمعدانی و یک جدایه از گونه‌ای Malva را براساس انگشت نگاری ژنتیکی با BOX-PCR در یک گروه، جدایه‌های به‌دست آمده از دانه‌داران، یک جدایه شمعدانی، دو جدایه از هلو به‌همراه یک جدایه استاندارد در گروه دوم و جدایه‌های به‌دست آمده از غلات همراه با یک جدایه از چغندر و یک جدایه از هلو، در گروه سوم از سه گروه قرار گرفتند. (Mosivand et al. 2009). rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC1 و ERIC2، توانستند جدایه‌های شبه *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر را از جدایه‌های عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و سوختگی برگ غلات متمایز سازند.

نوع دیگر توالی‌های تکرار شونده، توالی‌های تکراری پراکنده دارای یک توانایی منحصر به فرد هستند؛ به‌طوری که در ژنوم حرکت می‌کنند به‌همین دلیل به آنها توالی‌های دی ان ای متحرک گفته می‌شود (Majd and Shariatzadeh, 2015). توالی‌های الحاقی (IS) از خانواده‌های مختلف به‌عنوان توالی‌های دی ان ای متحرک در ژنوم باکتری‌ها و دیگر موجودات زنده گسترده هستند (Berg and Howe, 1989). اندازه توالی‌های الحاقی از ۱۳۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید متغیر است، بخش مرکزی یک IS یک پروتئینی که به‌نام ترانسپوزاز نامیده می‌شود، کد می‌کند (Mohamadnia et al. 2015). توالی‌های الحاقی در مطالعات تنوع ژنتیکی، نوآرایی ژنومی و

به‌وسیله سرنگ انسولین روی سطح برگ‌های سالم گیاهچه‌ها هلو و بادام پاشیده شد. به‌منظور اثبات بیماری‌زایی روی سر-شاخه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون توسط سرنگ سترون به زیر پوست ساقه گیاهچه‌های هلو و بادام تزریق شد. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در گلخانه نگهداری شدند. بعد از گذشت ۱۰ روز گیاهچه‌های هلو و بادام از نظر بیماری‌زایی ارزیابی شدند. برای این منظور براساس سرعت توسعه بیماری و شدت علائم، از ۴ درجه یا مقیاس (نمره صفر تا ۳) استفاده شد (Abbasi et al. 2013a). برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، میانگین و انحراف معیار داده‌های به‌دست آمده برای همه جدایه‌ها محاسبه گردید.

استخراج DNA ژنومی

جداسازی دی ان ای ژنومی از سلول‌های باکتریایی به‌روش تجزیه قلیایی انجام شد (Arabi et al. 2006). از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها، سوسپانسیونی در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد. به‌منظور تجزیه شدن سلول‌ها، به اندازه ۰/۱ حجمی 10 KOH درصد به هر سوسپانسیون اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه تجزیه شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس لایه رویی به‌عنوان دی ان ای از لوله‌ها برداشته و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای حصول اطمینان از وجود دی ان ای خالص در نمونه‌های خالص‌سازی شده، ۵ میکرولیتر از دی ان ای فوق همراه با یک میکرولیتر محلول برم فنول بلو در سوکروز روی مینی ژل آگاروز به غلظت یک درصد در ۷۰ ولت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. وجود یک باند با وزن مولکولی بالا و بدون کشیدگی در طول ژل به‌عنوان معیار مناسب بودن کیفیت دی ان ای تلقی گردید.

(NAS) (Sucrose) به‌صورت مخطط کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. تک کلنی‌های به رنگ کرم مایل به زرد و محدب انتخاب و مجدداً روی محیط آگار غذایی خالص شد (Abbasi et al. 2011). جهت نگهداری جدایه‌ها از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیون غلیظی در میکروتیوب‌های حاوی آب مقطر سترون، تهیه و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Schaad et al. 2001).

آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای

کلیه جدایه‌ها در آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای بررسی شد. تعیین واکنش گرم، تولید رنگدانه فلورسنت، فعالیت کاتالاز، تولید اوره‌آز، احیای نترات، توانایی رشد در دماهای ۴، ۳۷ و ۳۹ درجه سلسیوس، هیدرولیز نشاسته و توئین ۸۰، آزمون توانایی استفاده از برخی منابع هیدروکربنی، آزمون LOPAT (تولید لوان، اکسیداز، فعالیت پکتولتیکی، تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی شمع‌دانی)، آزمون GATTa (ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، فعالیت تیروزیناز و استفاده از تارتارات)، رشد هوازی/بی‌هوازی، تحمل رشد در نمک طعام به‌همراه سایر آزمون‌های رایج با استفاده از روش‌های متداول در باکتری شناسی گیاهی انجام شد (Schaad et al. 2001).

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های هلو (رقم لورینگ) و بادام (رقم شاهرودی) سه ماهه به‌روش تزریق سوسپانسیون بافت گیاهی انجام شد (Thomidis et al. 2005). برای اثبات بیماری‌زایی روی برگ از کشت‌های ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتریایی، سوسپانسیونی با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر (بر اساس کدورت سنجی با اسپکتروفتومتر با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد. به‌وسیله سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون

تهیه محلول پایه

برای تهیه محلول پایه جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دو روش به کار برده شد. روش اول برای آغازگرهای اختصاصی گونه D21/D22 و آغازگرهای گروه rep و روش دوم برای آغازگر گروه IS استفاده شد. در روش اول محلول پایه برای هر واکنش در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر شامل PCR buffer 1X، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۲/۵ واحد Taq DNA polymerase و ۲ میکرولیتر (حدود ۵۰ نانوگرم) دی ان ای ژنومی تهیه شد. در روش دوم برای تهیه محلول پایه از مجموعه کیت Accu Power PCR Premix خریداری شده از شرکت تکاپوزیست استفاده شد؛ این کیت‌ها به صورت لیوفیلیزه^۵ و آماده انجام واکنش‌های PCR هستند. حجم نهائی واکنش در این کیت‌ها معادل ۲۵ میکرولیتر است که برای آماده‌سازی آن‌ها ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۲ میکرولیتر (حدود ۵۰ نانوگرم) دی ان ای ژنومی و ۲۲ میکرولیتر اب دو بار تقطیر به هر یک اضافه شد.

تشخیص جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه

تشخیص جدایه‌های باکتری عامل بیماری در سطح گونه در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی گونه D21/D22 مورد بررسی قرار گرفت (Manceau and Horvais, 1997). توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR.
Table 1. Name and sequence of primers used in PCR.

آغازگر (Primers)	توالی (Sequence)
D21	5'- AGC CGT AGG GGA ACC TGC GG -3'
D22	5'- TGA CTG CCA AGG CAT CCA CC -3'
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'
rep ERIC1R	5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
ERIC2	5'-AAGTAAGT GACTGGGGTGAGCG -3'
IS IS50	5'-CAGGACGCTACTTGTGT-3'

⁵ Lyophilisation

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر کوربت (Corbet Research- CGI-96 ساخت کشور استرالیا) انجام شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی دی ان ای ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، به مدت ۱ دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه انجام شد. ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از توالی‌های تکرار شونده الف- روش rep-PCR

در این روش انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای BOXA1R، ERIC1R و ERIC2 (گیلبرت و همکاران ۲۰۰۹)، انجام گردید. در برنامه تکثیر دی ان ای برای BOX-PCR؛ ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۷ چرخه شامل واسرشته‌سازی دی ان ای ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۱ درجه سلسیوس، به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در برنامه تکثیر دی ان ای برای ERIC-PCR؛ ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۷ چرخه شامل واسرشته‌سازی دی ان ای ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۴۸ درجه سلسیوس، به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

ب- روش IS-PCR

در این روش انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر IS50 (گیلبرت و همکاران، ۲۰۰۹)، انجام گردید. در

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

جدایه‌ها روی محیط کشت آگار مغذی کلنی‌های مدور، به رنگ کرم متمایل به زرد، لزج و برآمده و روی محیط کشت YDC کلنی‌های مدور، کرم رنگ و غیر لزج تولید نمودند. حاشیه کلونی در تمامی جدایه‌ها صاف بود. جدایه‌ها بعد از ۲ الی ۳ روز روی محیط KB رنگدانه فلورسنت تولید نمودند. جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل، متحرک، هوازی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند و قادر به تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و استفاده از ال-تارتارات نبودند. در برگ‌های شمعدانی واکنش فوق حساسیت ایجاد کردند. بر مبنای ویژگی‌های فهرست شده در جدول ۲ و مقایسه آن‌ها با نتایج سایر پژوهشگران، اکثر جدایه‌های مورد بررسی بیشترین شباهت را به *Pss* دارند (Schaad *et al.*, 2001). خصوصیات این جدایه‌ها با جدایه مرجع RIPF110 یکسان بودند اما با جدایه مرجع RIPF760 کاملاً مطابقت نداشتند.

ارزیابی آزمون بیماری‌زایی

از آنجایی که *Pss* می‌تواند در سطح گیاه به صورت اپی‌فیت بقا داشته باشد (Schaad *et al.*, 2001) بنابراین همراهی باکتری با گیاه دلیلی بر بیماری‌زایی آن نبوده و انجام آزمون بیماری‌زایی ضروری است. نتیجه آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب به گیاهچه‌های هلو و بادام نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید علائم لکه‌برگی و شانکر در هلو و بادام پس از ۱۰ روز بودند. علائم در برگ به صورت لکه‌های آب‌سوخته که به تدریج از قسمت وسط بافت مرده می‌شد و در ساقه به صورت زخم‌های سیاه فرورفته مشاهده گردید (شکل ۱). تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده بر مبنای درجه بیماری‌زایی صفر تا ۳ نشان داد که همه جدایه‌ها دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی هستند. برای حصول اطمینان از نتایج آزمون بیماری‌زایی، جدایه‌ها باکتری دوباره از لکه‌ها و شانکرها جداسازی شدند. جدایه‌های مرجع در آزمون بیماری‌زایی علائم مشابهی را نشان دادند و در گیاهچه‌های شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، علائمی ظاهر نشد.

برنامه تکثیر دی ان ای برای IS-PCR ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۷ چرخه شامل واسرشته‌سازی دی ان ای ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۳۸ درجه سلسیوس، به مدت ۱ دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳/۵ دقیقه انجام شد و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR و آنالیز خوشه‌ای داده‌ها

محصولات PCR توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد به همراه دو نشانگر استاندارد جرم مولکولی (-DNA Ladder 100 and 500 bp ساخت شرکت Fermentase آلمان) و در بافر TBE (1X) تفکیک، توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از به دست آمدن انگشت‌نگاری ژنومی با سه روش BOX-PCR، ERIC-PCR و IS-PCR بر اساس وجود و یا عدم وجود باند، آنالیز خوشه‌ای داده‌ها در برنامه NTSYSpc 2.02e (رولف، ۱۹۹۰)، براساس ماتریس شباهت به روش داده‌های جفت شده غیر وزنی (UPGMA^۶) و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام شد. برای به دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر و با ثبات‌تر، آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده از روش‌های یاد شده به صورت ترکیبی نیز انجام شد.

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی

در مجموع ۲۳ جدایه از درختان میوه هسته‌دار با علائم لکه‌برگی و شانکر در مناطق مورد مطالعه جداسازی گردید (جدول ۱). دو جدایه مرجع *Pss* با کدهای RIPF110 و RIPF760 هدایی دکتر مونیکا کالوزنا^۷ در همه مراحل این تحقیق در کنار جدایه‌های فوق بررسی شد.

^۶ Unweight pair-group method with arithmetic means

^۷ Monika Kaluzna

جدول ۲- جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* استفاده شده در این تحقیق.

Table 2. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains used in this research.

Host	Origine	Strain
Almond	Khorasan-nishapur	B ₁₀ B ₁₃
	Khorasan-kashmar	B ₁ B ₁₁ B ₅ B ₆ B ₂ B ₃ B ₄ B ₇ B ₈
	Khorasan-sabzevar	B ₉
	Khorasan-mashhad	B ₁₂
Apricot	Khorasan-mashhad	Z1 Z6
	Khorasan-sabzevar	Z2 Z3
Peach	Khorasan-kashmar	Z4 Z5
	Khorasan-bojnord	H1 H2 H3
Plum	Khorasan-nishapur	A1
Cherry	Poland	RIPF110
	Poland	RIPF760

جدول ۳- ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جمع‌آوری شده

از استان‌های خراسان رضوی و شمالی.

Table 3. Biochemical, physiological and nutritional properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains collected from the provinces of Razavi and North Khorasan.

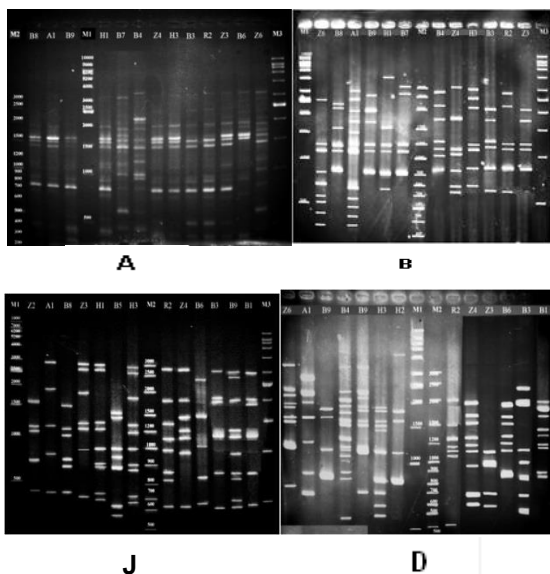
Response of Bacterial strains	Test	Response of Bacterial strains	Test	
+	Glucose	-	Gram reaction	
+	Sucrose	+	Levan production	
+	Sorbitol	-	Oxidase production	
+	Galactose	-	Potato soft rot	LOPAT test
+	Fructose	-	Arginine dihydrolase	
+	Mannitol	+	Hyper sensitivity reaction	
+	Mannose	Use of hydrocarbon resources	Hydrolysis of gelatin	
+	Arabinose	V	Hydrolysis of aescolin	GATTa test
-	Trehalose	-	Tyrosinase	
-	Inositol	-	L-tartrate	
+	Cellobiose	+	Aerobic growth	
-	Raffinose	-	Anaerobic growth	
+	Rhamnose	+	Growth at 37 C	Growth features
-	Lactose	V	Growth at 4 C	
+	Tween 80	V	Growth at 39 C	
-	Casein	+	5% NaCl tolerance	
-	Starch	-	7% NaCl tolerance	
+	Catalase	-	H ₂ S production from cystein	H ₂ S production
-	Urease	-	H ₂ S production from peptone	
+	Phosphatase	-	H ₂ S production from thiosulfate sodium	
-	Nitrate reduction	+	Production of fluorescent pigment in KB culture medium	
+	Production of resuscitation materials from sucrose	-	Indole acetic acid production	



شکل ۱- نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، سمت راست: علائم لکه بافت مرده روی برگ سمت چپ: علائم

زخم‌های سیاه فرورفته در شاخه.

Fig. 1. Results of pathogenicity tests of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. Right to Left: Symptom of necrotic spot on leaf and blight on shoot.



شکل ۳- انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

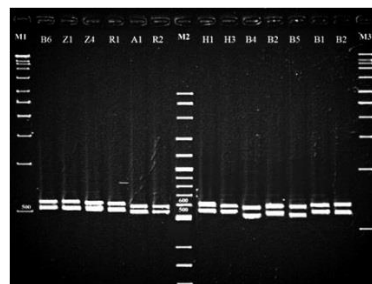
با استفاده از آغازگرهای rep-PCR و IS-PCR.

(الف BOXA1R، ب) ERIC1R، ج) ERIC2 و د) IS50 (M3-M1. IS50 و (د) ERIC2 (ج) ERIC1R، (ب) BOXA1R، (الف) IS50) نشانگر مولکولی 500 bp (M2)، نشانگر مولکولی 100 bp (R2)، جدایه مرجع RIPF110.

Fig. 3. Genomic fingerprinting of isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, using primers for rep-PCR and IS-PCR, A) BOXA1R, b) ERIC1R, c) ERIC2 and d) IS50. M1- M3) molecular marker 500 bp, M2) molecular marker 100 bp, R2) reference isolate RIPF110.

تشخیص جدایه‌ها در سطح گونه

تشخیص تمامی جدایه‌ها در سطح گونه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای D21/D22 اختصاصی گونه انجام شد. تمامی جدایه‌ها دو باند با اندازه تقریبی ۵۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز تکثیر نمودند که مشابه به دو جدایه مرجع RIPF760 و RIPF110 بودند (شکل ۲).



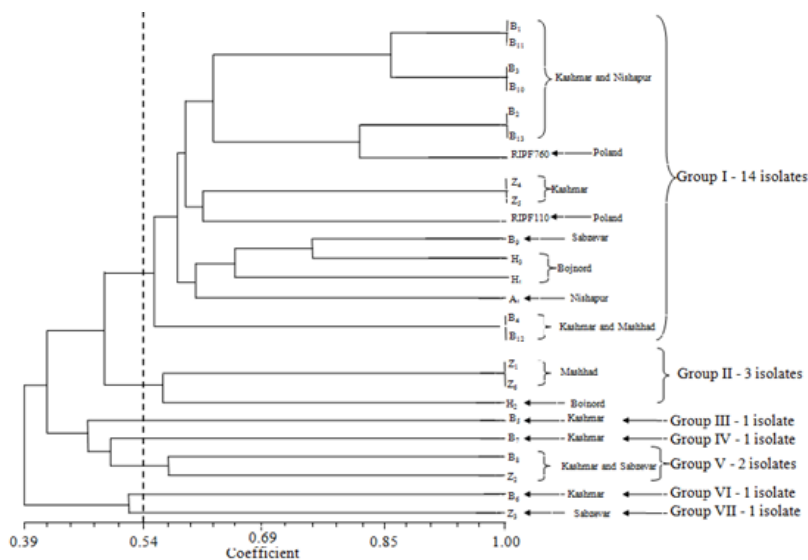
شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌ها با استفاده از جفت

آغازگر D21/D22 اختصاصی گونه *Pseudomonas syringae* (M3-M1)

(نشانگر مولکولی 500 bp (M2)، نشانگر مولکولی 100 bp (R1)

جدایه مرجع RIPF760 (R2)، جدایه مرجع RIPF110.

Fig. 2. Electrophoretic pattern of the PCR product of the isolates using D21/D22 primer pair of *Pseudomonas syringae* species M1- M3, molecular marker 500 bp; M2, molecular marker 100 bp; R1 and R2, reference isolates of RIPF760 and RIPF110.



شکل ۴- دندروگرام تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از rep-PCR و IS-PCR. خوشه‌بندی

براساس ضریب تشابه جاکارد انجام شده است.

Fig. 4. Dendrogram of genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* based on combined analysis of data from rep-PCR and IS-PCR. Clustering is done based on Jaccard's similarity coefficient.

تشخیص داده شدند و به منظور شناسایی گونه و پاتوارهای این جنس، آزمون‌های تکمیلی انجام شد. جدایه‌های مورد مطالعه با آزمون‌های گروه LOPAT ارزیابی شدند؛ این جدایه‌ها به خاطر تولید لوان، عدم تولید اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز، نداشتن توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ‌های شمعدانی جز گروه یک سودوموناس‌ها بوده و به‌عنوان گونه *Pseudomonas syringae* شناسایی شدند (Palleroni, 2005). گروه دیگری آزمون‌ها که اصطلاحاً سری GATa نامیده می‌شوند شامل: G: ذوب ژلاتین، A: هیدرولیز اسکولین، T: فعالیت تیروزیناز، T: استفاده از تارتارات می‌باشد (Gilbert et al., 2009) و بررسی نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های این گروه نشان داد واکنش جدایه‌ها به دو آزمون ذوب ژلاتین و هیدرولیز اسکولین متنوع است. این تنوع هم در بین جدایه‌های درختان بادام و هم در بین سایر جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار وجود داشت و نمی‌توانست مشخصه جدایه‌های بادام به حساب آید. جدول استاندارد مربوط به ویژگی‌های فنوتیپی پاتوار *Pss*، وجود تنوع در آزمون ذوب ژلاتین، بین جدایه‌های این پاتوار را تأیید نمود (Schaad et al., 2001). تحقیقات Roos and Hattingh (1987) نشان داد که جدایه‌هایی از عامل شانکر که از لحاظ ذوب ژلاتین مثبت ولی هیدرولیز اسکولین منفی هستند جزء فرم‌های حدواسط *Pss* و *Pv*. *Pseudomonas syringae morsprunorum* (*Psm*) محسوب می‌شوند. گزارش دیگری از فرم‌های حدواسط *Psm* و *Pss* در بین جدایه‌های عامل شانکر از درختان آلبالوی وحشی و گیلاس وجود دارد (Vicent et al., 2004). سایر خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها شامل رشد در نمک طعام ۵ درصد، آرابینوز، سوربیتول، مانیتول، مانوز، استفاده از سیترات، رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با خصوصیات پاتوار *Pss* مطابقت داشت (Schaad et al., 2001). با توجه به ویژگی‌های فنوتیپی ذکر شده، اکثر جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به‌عنوان پاتوار *Pss* و تعداد معدودی نیز با ویژگی‌های بینابین

تنوع ژنتیکی جدایه‌ها براساس rep-PCR و IS-PCR

تنوع ژنتیکی تمامی جدایه‌ها براساس rep-PCR و IS-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BOXA1R، ERIC1R، ERIC2 و IS50 بررسی شد. تمامی آغازگرها قادر به تکثیر باندهای مناسب در دامنه به اندازه تقریبی ۲۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز بودند (شکل ۳، A, B, J, D). نتایج آنالیز خوشه‌ای داده‌ها نشان داد که در BOX-PCR با آغازگر BOXA1R در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه‌ها به ۷ گروه؛ در ERIC-PCR با آغازگر ERIC1R در سطح تشابه ۶۵ درصد، جدایه‌ها به ۷ گروه و با آغازگر ERIC2 در سطح تشابه ۵۶ درصد، جدایه‌ها به ۸ گروه و در IS-PCR با آغازگر IS50 در سطح تشابه ۵۲ درصد، جدایه‌ها به ۱۱ گروه قابل تفکیک هستند. آنالیز خوشه‌ای داده‌های ترکیبی هر چهار آغازگر نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه ۵۴ درصد به ۷ گروه قابل تفکیک هستند (شکل ۴).

بحث

بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار از عوامل مهم خسارت‌زا در باغ‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی است. با توجه به سطح زیر کشت بالا و تنوع درختان میوه هسته‌دار کاشته شده در این مناطق، بررسی تنوع در خصوصیات باکتری عامل بیماری می‌تواند از جنبه مدیریت بیماری مورد توجه باشد. بر همین اساس در تحقیق حاضر خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار جدا شده از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی بررسی شد. خصوصیات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای 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 داشتند (Palleroni, 2005) بنابراین در اولین گام جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق متعلق به جنس سودوموناس

آنالیز شدند، ارائه داد. برای یک خوشه‌بندی با ثبات، بهتر است داده‌ها با هم ترکیب شوند (Abbasi et al., 2011). موسیوند و همکاران (Mosivand et al., 2009) نیز برای به‌دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر از آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از آغازگرها استفاده کردند. بررسی نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در جدایه‌های عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار به‌دست آمده از استان‌های خراسان رضوی و شمالی است. در گروه‌بندی تجمعی، اکثر جدایه‌های به‌دست آمده از درختان بادام در یک گروه قرار گرفتند، اگرچه جدایه‌هایی از هلو، زردآلو و آلو نیز در کنار جدایه‌های بادام جای گرفتند (شکل ۴) و این بیانگر آن است که با وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های بادام و جدایه‌های به‌دست آمده از سایر درختان میوه هسته‌دار در این تحقیق، به لحاظ تخصص یافتگی میزبانی دارای تمایز نسبی هستند. محدود جدایه‌هایی که در آزمون‌های فنوتیپی از لحاظ ذوب ژلاتین و هیدرولیز اسکولین با بقیه متفاوت بودند در خوشه‌بندی نیز در گروه‌های نسبتاً متمایزتری قرار گرفتند. یکی از دلایل تنوع بالا بین جدایه‌های عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار احتمالاً به‌دلیل سابقه طولانی کشت این درختان در استان‌های یاد شده می‌باشد، به‌طوری که میکروفولور همراه، با گذشت زمان با میزبان‌های مختلف هسته‌داران سازگار شده‌اند. تنوع در میان جدایه‌های مختلف این پاتووار به دلیل گسترده بودن دامنه میزبانی آن به مراتب بیشتر از سایر پاتووارهای گونه *Pseudomonas syringae* است (Roos and Hattingh, 1987). تحقیق حاضر نشان داد ارتباط مشخصی بین گروه‌های به‌دست آمده با مناطق جغرافیایی جدایه‌ها، ویژگی‌های فنوتیپی و یا میزبان آن‌ها وجود ندارد که می‌تواند نشان‌دهنده ورود باکتری به این استان‌ها همراه با اندام‌های آلوده از مناطق متنوع جغرافیایی باشد. به نظر می‌رسد استفاده از دو روش rep-PCR و IS-PCR راهکاری سریع و مناسب برای بررسی پلی مورفیسم (Polymorphism) می‌باشد، بدون آن که نیاز به دی ان ای خالص باکتری باشد،

پاتووارهای *Psm* و *Pss* در درختان میوه هسته‌دار تشخیص داده شدند. در مجموع واکنش تمامی جدایه‌های *Pss* در آزمون‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مشابه یکدیگر بوده و اختلافات جزئی نشان دادند. واکنش تمامی جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه Little et al (1998) و Najafipour and Taghavi (2011) در آزمون‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مشابه یکدیگر بودند. به نظر می‌رسد تکیه بر ویژگی‌های فنوتیپی به تنهایی برای نشان دادن تنوع بین جدایه‌ها *Pss* اطمینان بخش نیست.

در آزمون بیماری‌زایی تمامی جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه روی گیاهچه‌های هلو و بادام توانایی ایجاد علائم شاخص بیماری را داشته و با دارا بودن درجه بیماری‌زایی ۳ یا نزدیک به ۳، از لحاظ شدت بیماری‌زایی شباهت بالایی به همدیگر داشتند. علائم مشاهده شده شامل لکه‌های آب‌سوخته در برگ و شانکر در شاخه بود که اغلب تا ۱۰۰-۷۵ درصد ناحیه مایه‌زنی شده گسترده می‌شد. این علائم با علائم مشاهده شده در پژوهش‌های دیگر تطابق داشت (Little et al. 1998؛ Najafipour and Taghavi, 2011). تفاوت چندانی در مدت زمان لازم برای ظهور علائم بیماری در بین جدایه‌ها مشاهده نگردید.

جهت تأیید جدایه‌های تشخیص داده شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای D21/D22 اختصاصی گونه انجام شد و تکثیر دو باند با اندازه تقریبی ۵۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز تأیید گونه *Pseudomonas syringae* بود. وجود دو باند نزدیک به هم نشان‌دهنده وجود چند اپران در ژنوم این باکتری‌ها است.

آنالیز خوشه‌ای جدایه‌ها براساس rep-PCR و IS-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ERIC1R، BOXA1R، ERIC2 و IS50 نشان داد که جدایه‌های جمع‌آوری شده در این بررسی در چندین گروه قرار گرفته و آنالیز خوشه‌ای داده‌های ترکیبی هر چهار آغازگر، خوشه‌بندی با ثبات‌تری نسبت به حالتی که در آن داده‌های هر یک از آغازگرها به‌صورت جدا

مطالعه‌های تکمیلی با تعداد بیشتری جدایه جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی وسیع‌تر انجام شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌خاطر حمایت مالی از این پژوهش و از دکتر مونیکا کالوزنا برای اهدای جدایه‌های مرجع RIPF110 و RIPF760 قدردانی به‌عمل می‌آید. همچنین از آقایان مهندس اسفندیار ظهور پرالک و مهندس میثم تقی نسب بابت کمک‌های بی‌دریغشان نهایت تشکر را دارم.

به طوری که در این بررسی در مرحله استخراج دی‌ان‌ای از روش تجزیه قلیایی استفاده شد که روشی سریع، ساده و کم‌هزینه است. پیش از این نیز سرعت، دقت و توانایی این دو روش در موارد زیادی، در خصوص جدایه‌های *Pss* به اثبات رسیده است (Dawson et al. 2002؛ Menard et al., 2003؛ Vicent et al. 2004؛ Kang and Gilbert et al. 2009). نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مورد مطالعه بود اگرچه نیاز است

References

- ABBASI, V., RAHIMIAN, H. and TAJICK-GHANBARI, A., 2013a. Identification and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains causing bacterial canker in stone fruits in several northern and central provinces. *Journal of Plant Production Research* 20(3): 27-48.
- ABBASI, V., RAHIMIAN, H. and TAJICK-GHANBARI, A., 2013b. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal Plant Pathology* 135: 225-235
- ABBASI, V., RAHIMIAN, H., TAJICK-GHANBARI, M. and REZAIAN, V., 2011. Assessment of genetic diversity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker in stone fruits in some northern provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 47(4): 389-404.
- AGRIOS, G.N., 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press.
- ARABI, F., NIKRAVESH, Z., BABAEIZAD, V., REZAEIAN, V. and RAHIMIAN, H., 2006. Occurrence of bacterial blight disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 42(1): 665-669.
- BAHAR, M., MOJTAHEDI, H. and AKHYANI, A., 1982. Apricot bacterial cancer in Isfahan. *Iranian Journal of Plant Pathology* 18(3): 58-68.
- BANAPUR, A., ZAKAI, Z. and AMANI, G., 1989. Isolation of *Pseudomonas syringae* from cherry trees in Tehran province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 26(1): 67-72.
- BERG, D.E. and HOWE, M.M., 1989. *Mobile DNA*. Washington. D.C: American Society of Microbiology Publication.
- 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: 21-33.
- 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.
- 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.

- GONZALEZ, A.I., PEREZ, D.E. L.A. VEGA, M., RUIZ, M.L. and POLANCO C., 2003. Analysis of the arg K-tox gene cluster in nontoxic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Applied and Environmental Microbiology 69: 4979-4982.
- 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.
- 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(1): 4-17.
- 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.
- LOUWS, F.G., FULBRIGHT, D.W., STEPHANS, C.T. and BRUJIN, F.G., 1994. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovar and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60: 2286-2299.
- LOUWS, F.G., RADEMARKER, J.L.W. and BRUIJN, F.J., 1999. The three Ds of PCR-Based genomic analysis of phyto-bacterial diversity, detection and diagnosis. Annual Review of Phytopathology 37: 81-125.
- MAHILLON, J. and CHANDLER, M., 1998. Insertion sequences. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 725-744.
- MAJD, A. and SHARIATZADEH, M.A., 2015. Molecular cell biology. Ayiizh Publications.
- 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 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Applied and Environmental Microbiology 63: 491-505.
- MENARD, M., SUTRA, L., LUISETTI, J., PRUNIER, J.P., and GARDAN, L., 2003. *Pseudomonas syringae* pv. *avii* the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. European Journal of Plant Pathology 109: 565-576.
- MILGROOM, M.G. and FRY, W.E., 1997. Contribution of population genetics to plant disease epidemiology and management. Review of Plant Pathology 59: 153-168.
- MOHAMADNIA, A., BAHRAMI, N., TASHAKOR, A., JAHANBAZI, A. and VAZIRITABAR N., 2015. Molecular cell biology, Lodish (translation and editing). Shahid Beheshti University of Medical Sciences Publications.
- MOSIVAND, M., RAHIMIAN, H. and SHAMS-BAKHSI, M., 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from sugarcane, stone fruits and wheat. Iranian Journal of Plant Pathology 45(1): 85-98.
- NAJAFI POUR, G. and TAGHAVI, M., 2011. Comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 431-442.
- PALACIO-BIELSA, A., CAMBRA, M.A. and LOPEZ, M.M., 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). Journal of Plant Pathology 91(2): 249-297.
- PALLERONI, N.J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. Pp. 33-379 In: Brenner DJ, Krieg NR and Staley JT (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, USA.
- ROHLF, F.J., 1990. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Applied Biostatistics Inc. Exeter Software, New York, USA.
- ROOS, I.M. and HATTINGH, M.J., 1987. Systematic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced into petioles. Journal of Phytopathology 77: 1253-1257.
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B., and CHUN, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. APS Press.

- 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.
- VERSALOVIC, J., SCHEIDER, M., BRUIJN, F.J. and LUPSKI, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
- 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.
- 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.
- WEINGART, H. and VOLKSCH, B., 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP and IS_PCR. *Journal of Phytopathology* 145: 339-345.
- WOLSKA, K., SZWEDA, P., LADA, K., RYTEL, E., GUCWA, K., KOT, B. and PIECHOTA, M., 2014. Motility activity, slime production, biofilm formation and genetic typing by ERIC-PCR for *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bovine and other sources (human and environment). *Journal of Veterinary Sciences* 17(2): 321-329.