

استفاده از ژن پرآزاری سیرینگومایسین در گروه‌بندی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* *pv. syringae* عامل شانکر درختان زردآلو و بادام

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۳)

چکیده

در سال‌های اخیر با توجه به گسترش بیماری شانکر درختان زردآلو و بادام مشکوک به آلودگی با عامل *Pseudomonas syringae* *pv. syringae* (Pss) در استان آذربایجان شرقی، جهت ردیابی و شناسایی برخی از خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های بیمارگر Pss، نمونه-برداری از ۱۳ منطقه مختلف جغرافیایی استان انجام شد. از نمونه‌های مشکوک با علائم ظاهری شانکر، تعداد ۱۴ جدایه باکتری گرم منفی و تولیدکننده رنگدانه فلورسنت، بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و افتراقی LOPAT و GATTA به عنوان Pss شناسایی شدند. جدایه‌ها اختلاف بسیار جزئی در آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نشان دادند. تعیین ترادف بخشی از ناحیه ژنی *rpoD*، نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی و فنوتیپی را تأیید نمود. جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در مهار رشد رویشی پرگنه قارچ *Geotrichum candidum* با تولید زهرابه داشتند. در تمامی جدایه‌های Pss قطعه ۷۲۵ جفت‌بازی ژن *syfB* دخیل در سنتز زهرابه سیرینگومایسین ردیابی گردید. جدایه‌ها بر اساس آزمون بیماری‌زایی روی سرشاخه‌های بریده زردآلو به دو گروه پرآزار و کم‌آزار تقسیم شدند. تعیین ترادف بخشی از ژن *syfB* و رسم تبارنما با روش بایزین نشان داد که در میان ده جدایه مورد بررسی تنوع ژنتیکی وجود داشته و جدایه‌ها به دو گروه کاملاً متمایز تقسیم شدند. گروه‌بندی حاصله با گروه‌بندی به‌دست آمده بر اساس تعیین ترادف بخشی از ژن خانه‌دار *rpoD* مشابهت داشت.

کلیدواژه: آذربایجان شرقی، شانکر باکتریایی، تنوع، ژن *rpoD*، ژن *syfB*

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khakvar@tabrizu.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.
۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.
۳. پروفیسور گروه علوم بیماری‌شناسی گیاهی، فیزیولوژی و علف‌های هرز دانشکده کشاورزی و علوم زیستی، دانشگاه ویرجینیاتک، آمریکا.
۴. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر عباس، ایران.

Virulence-related syringomycin gene in grouping of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of canker on apricot and almond trees

Y. Vasebi¹, R. Khakvar^{2*}, B. Vinatzer³, and M.M. Faghghi⁴

(Received: 4.4.2017; Accepted: 25.9.2017)

Abstract

In recent years, due to the increase in canker symptoms on almond and apricot trees suspected to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) strains in East Azerbaijan province, detection and determination of some phenotypic characters and genetic characterizations of *Pss* strains were performed after sampling from 13 different geographical regions. A total of 14 Gram negative and fluorescent producing bacterial strains isolated from apparently diseased samples were identified as *Pss* based on biochemical and differential LOPAT and GATTa tests. Strains showed slight differentiation in morphological, biochemical and physiological tests. Partial sequences of the *rpoD* gene confirmed the results of the morphological and phenotypical tests. *Pss* strains had significant differences in regard to inhibition of *Geotrichum candidum* mycelial growth by toxin production. A 725-bp fragment of the *syrB* gene required for synthesis of syringomycin was amplified in all *Pss* strains. Based on pathogenicity tests on apricot twigs, strains were divided into two groups, one of higher and one of lower virulence. Partial sequences of the *syrB* gene and constructing a dendrogram using Bayesian inference showed genetic diversity among ten studied strains and divided them into two main groups. This grouping was similar to strains' grouping based on partial sequences of the *rpoD* gene.

Keywords: East Azerbaijan, bacterial canker, diversity, *rpoD* gene, *syrB* gene

*Corresponding author's E-mail: khakvar@tabrizu.ac.ir

1. Ph.D. Candidate of Plant Pathogenic Prokaryote, Plant Protection Group, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.
2. Associate Professor, Plant Protection Group, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.
3. Professor, Plant Pathology, Physiology and Weeds, Faculty of Agriculture and Bioscience, Virginia Tech University, US.
4. Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

مقدمه

با کاربرد چهار ژن خانه‌داری *cts*، *gapA*، *rpoD* و *gyrB* به ۲۳ گروه فیلوژنتیکی مجزا متمایز شده است. مطالعات مشخص نمود که گونه‌های ژنومی با گروه‌های تبارزایی ایجاد شده بر اساس روش MLST ارتباط نزدیکی دارند (Gardan *et al.* 1999, Sarkar & Guttman 2004, Hwang *et al.* 2005, Bull *et al.* 2011; Berge *et al.* 2014). چهار پاتووار گونه *P. syringae* از جمله *P. s. pv.* *morsprunorum*، *P. s. pv.* *syringae* و *P. s. pv.* *persicae* به عنوان عوامل شانکر و نکروز انتهایی درختان میوه هسته‌دار شناخته شده اند (Jones 1971, Latorre & Jones 1979, Endert & Ritchie 1984, Hattingh & Roos 1995, Barzic & Guittet 1996, Menard *et al.* 2003, Kaluzna *et al.* 2012). بیماری شانکر باکتریایی برای اولین بار در ایران توسط بهار و همکاران (Bahar *et al.* 1982) روی درختان زردآلو در استان اصفهان گزارش و خسارت آن بین ۲۲ تا ۵۰ درصد تخمین زده شد.

بیمارگر عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار، از طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زایی و پرآزاری از جمله زهرابه‌ها، هورمون‌های گیاهی، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، پروتئین‌های مولد هسته یخ، ترکیبات مقاوم به عوامل ضد میکروبی، عوامل تجزیه کننده ترکیبات آروماتیکی، آنزیم‌های تجزیه کننده زایلن و عملگرها در طول تعامل خود با میزبان استفاده می‌کنند تا علایم بیماری را در میزبانان خود القای کند (Hwang *et al.* 2005, Ichinose *et al.* 2013, Nowell *et al.* 2016). جدایه‌های مختلف پتووار *syringae* انواع مختلفی از زهرابه‌ها را تولید می‌کند. فیتوتوکسین سیرینگولین A (SylA) مولکول پپتیدی کوچک مهار کننده پروتئوزوم، به عنوان یک فاکتور پرآزاری در جدایه PsyB728a باعث باز شدن منافذ روزنه‌ها در لوبیا و آرابیدوپسیس می‌شود (2010 Schellenberg *et al.*).

در جدایه *Pss* عامل لکه قهوه‌ای

ایران به علت موقعیت خاص جغرافیایی و داشتن اقلیم‌های مختلف، در میان ده کشور اول تولیدکننده میوه قرار دارد (www.investiniran.ir). درختان زردآلو و بادام جزء درختان میوه هسته‌دار، متعلق به خانواده Rosaceae و جنس *Prunus* می‌باشند. ایران به لحاظ سطح زیرکشت بادام بعد از کشورهای اسپانیا و آمریکا در رتبه سوم جهان قرار دارد. زردآلو و بادام از محصولات عمده باغی استان آذربایجان شرقی می‌باشند. این استان به ترتیب با تولید ۱۶ درصد و هفت درصد این محصولات باغی، مقام اول و سوم را در کشور به خود اختصاص داده است (Ahmadi *et al.* 2016). این محصولات باغی به تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل قارچی، باکتریایی، ویروسی و فیتوپلاسمایی حساس می‌باشند. شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای این درختان می‌باشد (Agrios 2005). گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall 1902 مهم‌ترین گونه جنس سودوموناس اولین بار از گیاه یاس خوشه‌ای (*Syringae vulgaris*) جداسازی گردید (Gross & DeVay 1977a). جدایه‌های مختلف *P. syringae* حدود ۲۰۰ گونه گیاهی چوبی و علفی از خانواده‌های مختلف بیماری‌زا می‌باشند (Bradbury 1986). برای این گونه حدود ۶۰ پتووار توصیف شده است (Young 2010). مطالعات تبارزایی این گونه را یک گونه مرکب معرفی کرده است که بر اساس آنالیز تعیین ترادف چندژنگاهی (Multi Locus Sequence Analysis-MLSA) به پنج گروه، بر اساس پروفیل هیبریداسیون DNA-DNA به نه گروه گونه‌ژنومی (genomospecies) و با استفاده از آنالیزهای Multi Locus Sequence Typing

های *Pss* تولید کننده زهرابه سیرینگومایسین یا یکی از آنالوگ‌های آن حفاظت شده می‌باشند (Quigley & Gross 1994, Wang et al. 2006).

بررسی ترادف ژن‌های رمزگذار پروتئین از جمله ژن‌های *gyrB* و *rpoD* با داشتن یک کپی در ژنوم باکتری‌ها، جهت تمایز و تاکسونومی گونه‌های سودوموناس اولین بار توسط یاماموتو و همکاران (Yamamoto et al. 2000) پیشنهاد گردید. ژن *rpoD*، پروتئین ۷۰ کیلودالتونی سیگما فاکتور ۷۰ را کد می‌کند. سیگما فاکتور ۷۰، پروتئین ویژه شروع کننده رونویسی RNA پلی‌مراز می‌باشد (Lonetto et al. 1992, Fujita et al. 1995). این پروتئین منحصر به فرد در باکتری‌ها با تعداد زیادی محل‌های چند شکل پراکنده در طول ترادف ژنوم (۷۰/۴ درصد)، نشانگر زیستی مناسبی جهت بررسی‌های تاکسونومیک و تبارزایی گونه‌های سودوموناس می‌باشد (Yamamoto et al. 2000, Mulet et al. 2010). مطالعات قبلی مشخص کرده است که ژن *rpoD* ابزار مهمی در گروه‌بندی پتووارها به گروه‌های تبارزایی می‌باشد که با گونه‌های ژنومی *P. syringae* همبستگی دارد (Ferrante & Scortichini 2010, Bull et al. 2011, Sánchez et al. 2014).

در این پژوهش تلاش گردید که ابتدا میزان ارتباط بیماری شانکر درختان زردآلو و بادام در مناطق نمونه- برداری شده با جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* بررسی شود. سپس میزان تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از ژن سنتزکننده زهرابه سیرینگومایسین، *syfB*، به عنوان ژن حفاظت شده و یکی از فاکتورهای مهم پرآزاری بیمارگر، بررسی شده و گروه‌بندی جدایه‌ها با گروه‌بندی بر اساس ژن خانه‌داری *rpoD* مقایسه گردد.

لوبیا، فیتوتوکسین *SyIA* ترشح شده از محل‌های اولیه آلودگی، باعث مهار مقاومت اکتسابی در بافت‌های مجاور از طریق مهار پیام‌رسانی هورمون اسیدسالسیلیک می‌شود (Misas-Villamil et al. 2013). منگوتوکسین، فاکتور پرآزاری در جدایه *Pss* عامل نکروز انتهایی انبه، آنزیم اورنیتین ان-اسیتیل ترنس‌فراز-N (ornithine acetyltransferase) آنزیمی کلیدی در مسیرهای بیوستنز آرژنین و اورنیتین را مورد هدف قرار می‌دهد (Cazorla et al. 2003, Arrebola 2004, Carrión et al. 2014). زهرابه‌های سیرینگومایسین (*syf*) و سیرینگوپتین (*syf*) به دلیل ایجاد منافذ در غشای سلولی و نشت یون کلسیم که در سیستم پیام‌رسانی سلولی نقش دارد، باعث القای نکروز در میزبانان خود می‌شود. مقادیر بسیار کم در حد نانومولار از آن‌ها برای تشکیل منفذ و مرگ سلولی کفایت می‌کند از این رو این زهرابه در بیماری‌زایی *Pss* نقش مهمی دارد (Grgurina et al. 1996, Hutchison & Gross 1997, Zhang 1997, Guenzi et al. 1998, Bender et al. 1999). این زهرابه‌ها به استقرار باکتری در میزبان و رشد باکتری در فضای بین‌سلولی کمک کرده و فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بالایی دارند (Sinden et al. 1971). سورنسن و همکاران (Sorensen et al. 1998) شباهت جدایه‌های *Pss* را بر اساس سنتز لیپودپسی‌نونا-پپتیدهای حلقوی با استفاده از PCR بررسی کردند. اکثر جدایه‌ها یکی از پپتیدهای سیرینگومایسین، سیرینگواستاتین، سیرینگوتوکسین و سودومایسین را تولید می‌کردند. ردیابی قطعه ژنی حفاظت شده *syfB* با طراحی پرایمرهای الیگونوکلوئوتیدی اختصاصی در تکثیر با PCR، سریع‌ترین و مناسب‌ترین روش شناسایی جدایه‌های تولیدکننده این زهرابه‌ها معرفی گردید. ژن‌های *syfB* و *syfD* به صورت کپی‌های انفرادی در داخل ناحیه کوچکی از DNA به اندازه 15 کیلو جفت‌باز در بسیاری از جدایه-

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی

در بازدیدهایی به عمل آمده طی اسفندماه ۱۳۹۳ و فروردین‌ماه ۱۳۹۴ از درختان زردآلو و بادام شهرستان‌ها و روستاهای مختلف در استان آذربایجان شرقی شامل مرند، میانه، عجبشیر، اسکو، اسفهان، سپیدان، سردرود، شبستر، خسروشهر، باسمنج، ایلخچی، آذرشهر و زینجان، نمونه‌هایی از شاخه، تنه و شکوفه‌های گیاهان دارای علائم شانکر و خروج صمغ از تنه و شاخه و بلاست شکوفه جمع‌آوری و در داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شده و حداکثر به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. جداسازی باکتری عامل بیماری از هر نمونه گیاهی، به دو روش جداسازی رورستی و درون‌رستی انجام گرفت. در جداسازی به روش رورستی، پنج گرم از بافت‌های گیاهی، به قطعات یک سانتی‌متری بریده شده و در لوله‌های فالكون سترون حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سترون یک دهم مولار ریخته و به شدت به مدت ۱۰ دقیقه با دست تکان داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌ها با دو تکرار روی محیط‌های کشت آگار غذایی (NA) توسط میله شیشه‌ای خمیده به صورت چمنی کشت شد. در روش جداسازی درون‌رستی، پنج گرم از بافت‌های گیاهی، به قطعات یک سانتی‌متری بریده و به مدت ۱۰ دقیقه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس در لوله‌های فالكون سترون حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات منیزیم سترون یک صدم مولار ریخته و به مدت دو ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌ها با دو تکرار روی محیط کشت NA به صورت چمنی کشت شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸-

۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز نگهداری و مشخصات پرگنه باکتری‌ها ثبت گردید. از باکتری‌ها با کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون غلیظی در میکروتیوب‌های حاوی آب مقطر دوبار سترون تهیه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sands et al. 1970).

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی افتراقی

به منظور تشخیص و تفکیک جدایه‌های *Pss*، آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی انجام گرفت. این آزمون‌ها بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی شامل واکنش گرم در پتاس سه درصد، فعالیت کاتالازی، رشد هوازی/بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسنت محیط کینگ ب (KB)، آزمون‌های گروه LOPAT (تولید لوان، اکسیداز، لهیدگی سیب‌زمینی، تولید آرژینین دی‌هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی توتون) و GATTA (ذوب ژلاتین، هیدرولیز آسکولین، فعالیت تیروزینازی و مصرف تارتارات) انجام گردید (Klement et al. 1964, Fahy & Persley 1983, Schaad et al. 2001).

آزمون فوق حساسیت روی توتون

آزمون فوق حساسیت به عنوان معیاری برای توان بیماری‌زایی و توان سیستم ترشحاتی نوع سه در باکتری‌های بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^7 CFU/mL، در آب مقطر سترون تهیه و با سرنگ بدون سوزن سترون به زیر بشره برگ توتون بین دو اپیدرم تزریق شد. از آب مقطر سترون به عنوان نمونه شاهد منفی در آزمون استفاده گردید. پیدایش لکه‌های بافت مرده در قسمت تزریق شده، بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت، به عنوان واکنش مثبت تلقی گردید (Klement et al. 1964).

آزمون بیماری‌زایی

از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی، سوسپانسیونی با غلظت 10^7 CFU/mL در آب مقطر سترون تهیه و با استفاده از سوزن سرنگ انسولین، یک میلی‌لیتر به زیر پوست سرشاخه‌های سبز یک ساله و بریده شده درخت زردآلو در محل جوانه‌های شاخه تزریق گردید. شاخه‌های بریده شده جهت حفظ رطوبت در داخل محفظه پلاستیکی در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آب مقطر سترون به عنوان نمونه شاهد منفی در آزمون استفاده گردید. ظهور علائم با زخم‌های بافت‌مرد و پیشرفت آن در محل تزریق ۱۴ روز پس از تزریق مورد بررسی قرار گرفت (Mohammadi et al. 2001).

آزمون زیست‌سنجی تولید زهرا به سیرینگومایسین

سوسپانسیون ۲۴ ساعته از جدایه‌های *Pss* به غلظت 10^7 CFU/mL در آب مقطر سترون، به صورت خطی در یک طرف تشتک پتری حاوی محیط کشت Potato Dextros Agar (PDA) کشت شد. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از این مدت یک دیسک نیم سانتی‌متری از حاشیه فعال پرگنه ۴۸ ساعته قارچ *G. candidum* به عنوان ارگانسیم شاخص، مقابل پرگنه باکتری کشت شد. قطر هاله بازدارنده تشکیل شده در اطراف پرگنه باکتری پس از رسیدن رشد هیفی قارچ به لبه تشتک‌های پتری در شاهد اندازه‌گیری گردید. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده و آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (Young 1991, Bultreys & Gheysen 1999).

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA به روش Doyle & Doyle CTAB (1990) با اندکی تغییرات انجام شد. در این روش، پرگنه ۲۴ ساعته جدایه‌های *Pss* کشت شده روی محیط NA در ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB دو درصد (2% CTAB, 1.4M NaCl, 100 Mm Tris و 20Mm EDTA) به‌حالت سوسپانسیون درآمده و در حمام آب ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند. سپس ۸۰۰ میکرولیتر ترکیب کلورفرم-ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به لوله‌ها اضافه و سانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه انجام شد. رانشین برداشته و به داخل لوله سترون جدید منتقل شد. به اندازه دو سوم حجم رانشین برداشت شده، ایزوپروپانول سرد با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه انجام شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه شده و سپس سانتریفیوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه انجام شد. شستشوی رسوب با اتانول سه مرتبه انجام گرفت. میکروتیوب‌ها در دمای اتاق جهت خشک شدن قرار گرفتند. رسوب‌های DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شدند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با دستگاه نانودراپ (شرکت Allsheng مدل Nano-200 ساخت چین) و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام گرفت و در نهایت DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی حضور ژن رمزگذار زهرا به سیرینگومایسین در جدایه‌ها

به منظور ردیابی بخشی از ژن *syfB* در جدایه‌های *Pss*

نمونه‌ها به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۹۵ ولت در دمای اتاق روی ژل ران شدند. قطعات تکثیر شده تحت اشعه UV ایجاد شده توسط دستگاه ژل‌داک مشاهده شده و تصویر ژل ثبت گردید.

تعیین ترادف ژن‌های مورد استفاده در بررسی تنوع و

ترسیم تبارنماها

ده جدایه پرازار *Pss* به عنوان نماینده جدایه‌ها برای تعیین ترادف بخشی از ژن‌های *rpoD* و *syrB*، به منظور بررسی تنوع و گروه‌بندی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین ترادف ژن‌های مورد استفاده، محصولات PCR مربوط به هر ژن و هر جدایه به همراه هر یک از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشتی، جهت تعیین ترادف دو جهته به شرکت MacroGen (کره‌جنوبی) ارسال گردید. ترادف‌های به‌دست آمده پس از تعیین کیفیت با نرم‌افزار FinchTV v.1.4.0 و ویرایش بوسیله نرم‌افزار SeqMan™ II expert sequence analysis (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) در پایگاه اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) با برنامه BLASTN (megablast) با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. ترادف‌های *rpoD* و *syrB* باکتری‌های مرجع به‌کار رفته در بررسی تنوع بر مبنای حداکثر هم‌ردیفی با ترادف‌های مورد مطالعه ۹۹-۹۰ درصد با ارزش مورد انتظار (e-value) نزدیک به صفر در تحقیق حاضر انتخاب شدند. ترادف‌های ویرایش شده با استفاده از روش MUSCLE (Edgar 2004) در نرم‌افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 6 (Tamura et al. 2013) هم‌ردیف‌سازی شدند. تبارنماها بر مبنای استنتاج بایزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v.3.2.2 و الگوریتم مونت کارلو چین مارکوف (Markov Chain Monte Carlo -MCMC) با میانگین

از آغازگرهای اختصاصی B1 (5'-CTTTCCGTGGTCT و TGATGAGG-3') B2 (5'-TCGATTTTGCCGTGA و TGAGTC-3') در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) (دستگاه ترموسایکلر شرکت peQlab، آلمان) استفاده شد (Sorensen et al. 1998). برنامه حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۹۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱/۵ دقیقه، مرحله گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد سه دقیقه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

تکثیر ناحیه ژنی *rpoD*

با استفاده از آغازگرهای *rpoD*-Fp (5'-AAGGCGAR و *rpoD*-Rp (5'-ATCGAAATCGCCAAGCG و *rpoD*-R (3'-GGAACWKGCGCAGGAAGTCGGCACG) جهت تکثیر بخشی از ژن خانه‌داری *rpoD* استفاده شد (Sarkar and Guttman 2004). برنامه حرارتی و زمانی واکنش PCR به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱/۵ دقیقه، مرحله اتصال در ۶۳ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، مرحله گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دو دقیقه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه اجرا گردید. برای مشاهده محصولات PCR و ردیابی قطعات DNA تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد به همراه نشانگر ژنومی 100 جفت‌بازی (شرکت Fermentas، آلمان) انجام گرفت. از بافر TBE 1x بدین منظور استفاده گردید. جهت رنگ‌آمیزی، از بافر رنگی FluoroDye (شرکت SMOBio، کره‌جنوبی) استفاده شد.

جدایه‌های مورد نظر روی محیط آگار غذایی گرد، به رنگ کرم، برآمده با حاشیه صاف بود. تمامی جدایه‌ها هوازی اجباری و کاتالاز منفی بودند. در تحقیق حاضر، ۶۵ درصد جدایه‌ها به حالت رورستی و ۳۵ درصد به حالت درون-رستی جداسازی شدند. جدایه‌های *Pss* از نواحی جغرافیایی عجیشیر (۳ جدایه)، آذرشهر (۱ جدایه)، مرند (۱ جدایه)، شبستر (۱ جدایه)، سپیدان (۴ جدایه)، میانه (۱ جدایه) و سردرود (۳ جدایه) جمع‌آوری شدند. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.

آزمون فوق حساسیت و بیماری‌زایی

در این آزمون جدایه‌های *Pss* پس از گذشت ۲۴ ساعت از تلقیح سوسپانسون باکتریایی، دو نوع علائم روی برگ-های جوان توتون ایجاد کردند. در یک‌سری از جدایه‌ها علامت شاخص HR یعنی تشکیل مناطق بافت‌مرده و در گروه دیگری از جدایه‌ها زخم‌های آب‌سوخته غیرقابل برگشت در محل تلقیح باکتری ظاهر شد. هر دو گروه از جدایه‌ها، به‌عنوان جدایه‌هایی با القای واکنش مثبت در آزمون فوق حساسیت تلقی شده و برای آزمون بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). جدایه‌های بیماری‌زا، ۱۴ روز پس از تلقیح در سطح سرشاخه‌های بریده و سبز زردآلو، علائم مردگی بافت در مقایسه با شاهد نشان دادند. بر اساس وسعت بروز علائم، جدایه‌ها به دو گروه تقسیم شدند: ۱- جدایه‌هایی با زخم‌های بافت‌مرده کم‌عمق در محل تلقیح (جدایه‌های کم‌آزار) و ۲- جدایه‌هایی با زخم-های بافت‌مرده عمیق و وسیع (جدایه‌های پرآزار) (شکل ۱). زخم‌های بافت‌مرده عمیق و وسیع توسط جدایه‌هایی نمایان شد که علائم شاخص HR روی توتون القای کرده بودند، از جمله جدایه‌های Pss-26، Pss-82، Pss-170، Pss-174، Pss-176، Pss-186 و Pss-240. جدایه‌های *Pss*

انحراف معیار نرخ تقسیم ۰/۰۱، با ایجاد ۱۰۰۰۰۰۰۰۰ نسل و ذخیره یک تبارنما در هر ۱۰۰۰ نسل ترسیم شدند. پس از چشم‌پوشی از اولین ۲۵ درصد نسل‌ها به‌عنوان معیار burn-in، مابقی ۷۵ درصد تبارنماهایی که در هر نسل ذخیره شده بودند به صورت تبارنمای اجمالی همراه با مقادیر مربوط به توزیع احتمال پسین (posterior probability) ارائه شدند (Rannala & Yang 1996, Ronquist et al. 2012). بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدها برای هر ژنگاه با استفاده از معیار اطلاعاتی آکائیک (Akaike Information Criterion-AIC) (Akaike 1974) و نرم‌افزار MrModeltest v. 2.3 (Nylander 2004) اجرا گردید. تبارنماهای ترسیم شده با استفاده از برنامه FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) مشاهده شدند. درصد تشابه ترادف‌های هم‌تراز شده در جدایه‌های *Pss* با استفاده از نرم‌افزار MegAlign گنجانده شده در نرم‌افزار DNASTAR و گزینه فاصله ترادف‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

از درختان زردآلو و بادام نمونه‌برداری شده با علائم بیماری از ۱۳ ناحیه جغرافیایی مختلف، در کل ۲۹۳ جدایه باکتریایی جداسازی گردید. در میان ۱۵۰ جدایه گرم منفی شناسایی شده، تنها ۱۴ جدایه تولیدکننده فلورسنت روی محیط KB، بر اساس آزمون‌های گروه (+,-,-,+), LOPAT و (+,+,-,-), GATTA به‌عنوان جدایه‌های *Pss* متعلق به گونه‌ژنومی I شناسایی شدند (Lelliott et al. 1966, Lelliott & Stead 1987, Gardan et al. 1999). پرگنه

جدول ۱. برخی مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1. Some characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains used in this study.

نام جدایه / آزمون Test/strain	محل جمع آوری Origin	میزبان Host	جداسازی isolation	واکنش فوق حساسیت HR	بیماری زایی Pathogenicity
Pss-2	عجبشیر Ajabshir	بادام Almond	رورست epiphyte	++	++
Pss-4	عجبشیر Ajabshir	بادام Almond	درون‌رست endophyte	++	++
Pss-26	عجبشیر Ajabshir	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-56	آذرشهر Azarshahr	بادام Almond	درون‌رست endophyte	++	++
Pss-82	مرند Marand	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-125	شستر Shabestar	بادام Almond	رورست epiphyte	++	++
Pss-170	سپیدان Sepidan	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-172	سپیدان Sepidan	زردآلو Apricot	درون‌رست endophyte	++	++
Pss-174	سپیدان Sepidan	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-176	سپیدان Sepidan	زردآلو Apricot	درون‌رست endophyte	+++	+++
Pss-181	سردرود Sardroud	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-186	سردرود Sardroud	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++
Pss-200	سردرود Sardroud	بادام Almond	درون‌رست endophyte	++	++
Pss-240	میانه Mianeh	زردآلو Apricot	رورست epiphyte	+++	+++

+++ زخم‌های بافت‌مرده در آزمون فوق حساسیت و زخم‌های بافت‌مرده عمیق در آزمون بیماری‌زایی، ++ زخم‌های آب‌سوخته در آزمون فوق حساسیت و زخم‌های بافت‌مرده سطحی در آزمون بیماری‌زایی،

+++ necrotic lesions in hypersensitive reaction test and deep necrotic lesions in pathogenicity test; ++: water-soaked lesions in in hypersensitive reaction test and slight necrotic lesions in pathogenicity.

آزمون زیست‌سنجی تولید زهرابه سیرینگومایسین

مجدداً از گیاهان مایه‌زنی شده بر روی محیط KB

جدایه‌های PSS از طریق تولید زهرابه سیرینگومایسین یا برخی از ایزومرهای آن با تشکیل هاله بازدارنده از رشد

جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و تایید شدند.



شکل ۱. آزمون فوق حساسیت بر روی برگ‌های توتون (سمت راست)، a: علائم آب‌سوخته، b: علائم بافت مرده؛ آزمون بیماری‌زایی روی سرشاخه‌های سبز بریده زردآلو (سمت چپ)، a: زخم‌های بافت مرده کوچک و سطحی و b: زخم‌های بافت مرده وسیع و عمیق.

Fig 1. Hypersensitive reactions on tobacco leaves (right), a: water-soaked symptoms, b: necrotic symptoms; pathogenicity test on apricot twigs (left), a: slight necrotic lesions, b: deep necrotic lesions.

گردید (جدول ضمیمه ۱). ارتباط تبارزایی جدایه‌های مورد نظر بر اساس تعیین ترادف ژن‌های *rpoD* و *syfB* مقایسه با دیگر ترادف‌های موجود در بانک ژن انجام گرفت. در تعیین ترادف بخشی از ژن‌های *rpoD* و *syfB* در جدایه‌های به‌دست آمده از زردآلو و بادام قطعاتی به طول متوسط ۷۲۱ و ۵۵۱ جفت‌بازی به‌دست آمد. ترادف‌های ویرایش شده با ترادف‌های به‌دست آمده از بانک ژن، هم‌تراز شدند. بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدها برای هر دو ژنگاه *rpoD* و *syfB* مدل Hasegawa-Kishino-Yano with Gamma distribution (HKY+G) تعیین شده و تبارنماهای ترسیم شده با حداکثر احتمال پسین حمایت شدند.

نتایج تجزیه و تحلیل تبارنماهای ترسیم شده با آغازگرهای *rpoD* و *syfB* به‌صورت مجزا نشان داد که در هر دو تبارنمای به‌دست آمده جدایه‌ها با حداکثر احتمال پسین به‌طور مشابهی به دو گروه I و II گروه‌بندی شدند. در تبارنمای ترسیم شده بر اساس آغازگر *syfB*، گروه I، ۸۰ درصد جدایه‌ها را دربرداشت. در این گروه جدایه‌های ایران با تشکیل یک خوشه مجزا از جدایه‌های مرجع اخذ شده از بانک ژن NCBI (شکل ۳) متمایز شدند. با این

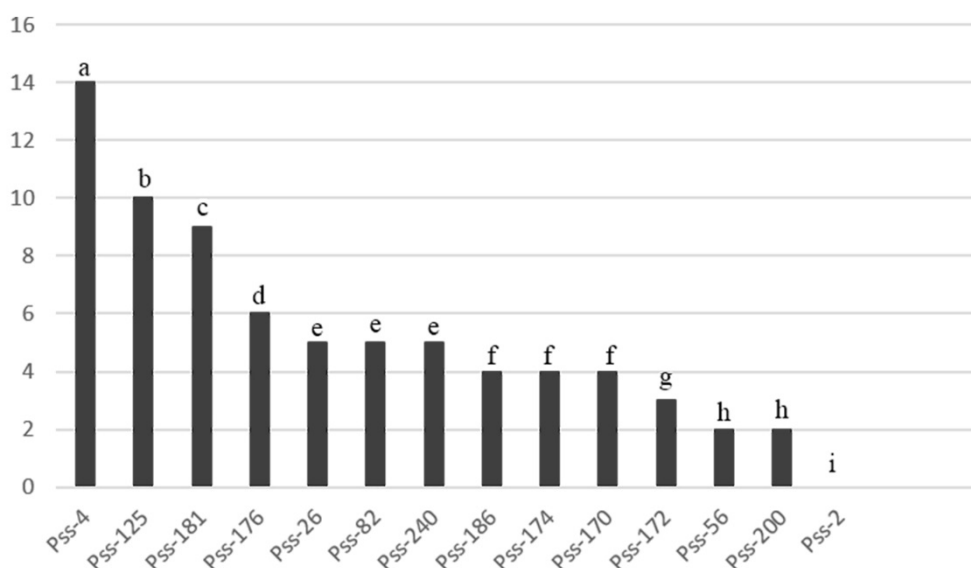
قارچ *G. candidum* بازدارنده‌های بیمارگر در این آزمون خصوصیات متفاوتی نشان دادند. اندازه هاله بازدارنده بین جدایه‌ها از ۰ تا ۱۴ میلی‌متر متغیر بود. جدایه‌های بیمارگر Pss-4، Pss-125 و Pss-181 با تشکیل بزرگ‌ترین هاله بازدارنده و جدایه Pss-2 بدون تشکیل هاله بازدارنده، به‌ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در مهار رشد رویشی قارچ داشتند (شکل ۲).

ردیابی ژن‌های *rpoD* و *syfB* در جدایه‌ها

ژن مولد زهرابه سیرینگومایسین در تمامی جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* با تکثیر قطعه ژنی حدود ۷۲۵ جفت‌بازی ردیابی گردید. در جدایه *P. s. pv. morspronorum* استفاده شده به عنوان کنترل منفی تکثیر انجام نشد. همچنین ژن سنتز کننده سیگما فاکتور ۷۰، *rpoD*، با تکثیر قطعه‌ای به اندازه حدود ۵۳۲ جفت‌بازی در تمامی جدایه‌ها ردیابی شد.

تعیین ترادف DNA و بررسی تنوع جدایه‌ها

ترادف ژن‌های *rpoD* و *syfB* در جدایه‌های مورد بررسی در بانک ژن، NCBI، با رس شمار معین ثبت



شکل ۲. میزان بازدارندگی از رشد رویشی قارچ *Geotrichum candidum* (بر حسب میلی‌متر) توسط جدایه‌های بیماری‌زای *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. ستون‌ها با حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار جدایه‌ها در مهار رشد قارچ در آزمون ANOVA می‌باشد.

Fig 2. Inhibition of *Geotrichum candidum* mycelial growth (mm) by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. The columns with different letters indicate significant difference in ANOVA assay.

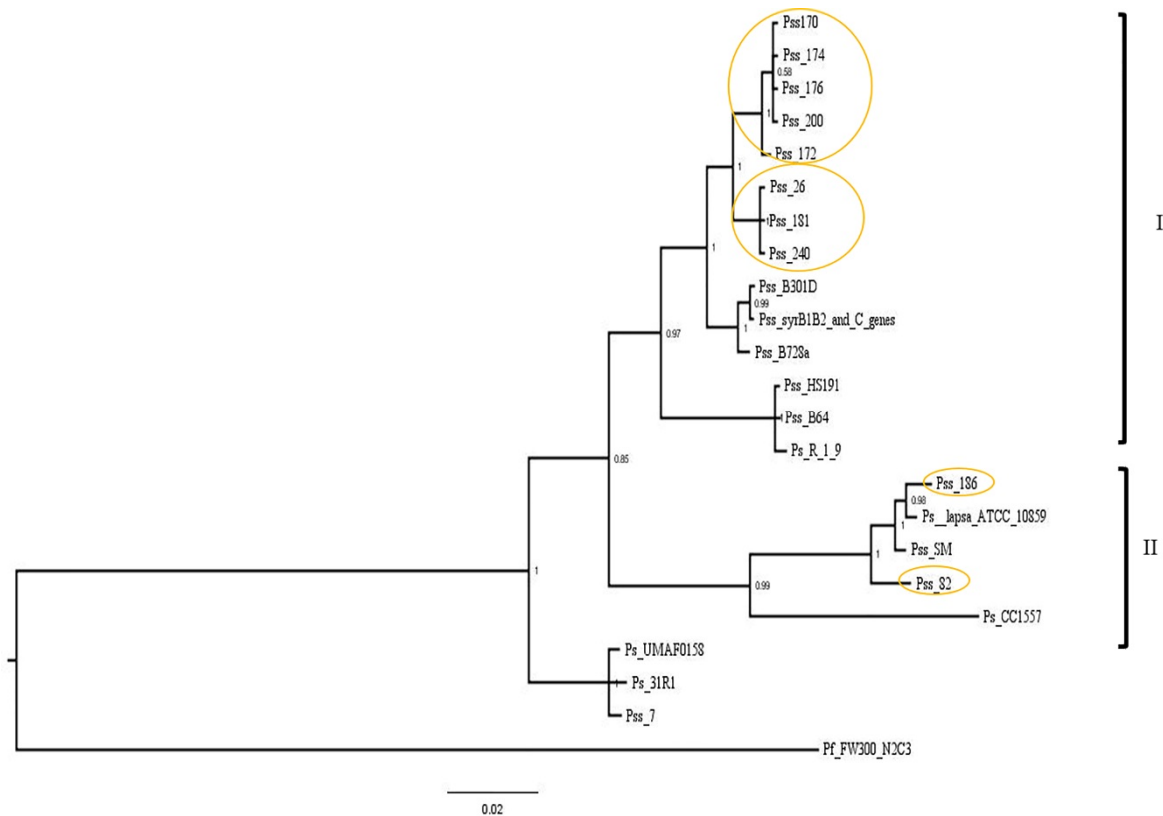
جدول ضمیمه ۱. رس‌شمار ترادف ژن‌های *rpoD* و *syrB* ثبت شده در NCBI از جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جداسازی شده در این مطالعه.

Table 2. Accession numbers of new sequences of the *rpoD* and *syrB* genes in NABI and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains collected for this study.

جدایه‌ها	رس‌شمارهای ژن <i>rpoD</i>	رس‌شمارهای ژن <i>syrB</i>
strains	Accession numbers of <i>rpoD</i> gene	Accession numbers of <i>syrB</i> gene
Pss-26	KY569198	KY569176
Pss-82	KY569199	KY569177
Pss-170	KY569200	KY569178
Pss-172	KY569201	KY569179
Pss-174	KY569202	KY569180
Pss-176	KY569203	KY569181
Pss-181	KY569204	KY569182
Pss-186	KY569205	KY569183
Pss-200	KY569206	KY569184
Pss-240	KY569207	KY569185

دو جدایه Pss-186 و Pss-82 بوده که در خوشه‌های مجزا از هم گروه‌بندی شدند (شکل ۳). در تبارنمای ترسیم شده با آغازگر *rpoD*، گروه I، اکثریت جدایه‌های ایرانی را در برداشت. جدایه‌های این گروه به دو زیر گروه تقسیم

حال جدایه‌های ایران خود به دو زیر گروه تقسیم شدند. در زیر گروه اول جدایه‌های Pss-174، Pss-170، Pss-176، Pss-200، Pss-172 و در زیر گروه دوم جدایه‌های Pss-26، Pss-181 و Pss-240 قرار گرفتند. گروه II شامل



شکل ۳. تبارنمای ترسیم شده برای جدایه‌های *Pseudomonas syringae* بر اساس ترادف‌های هم‌تراز ژن *syrB* (۶۴۵ نوکلئوتید) با روش Bayesian inference و مدل HKY+G. خط مقیاس نشان دهنده تعداد جایگزینی‌ها در هر محل می‌باشد. بر روی هر گره احتمال پسین به دست آمده از ۱۰۰۰۰۰۰۰۰ نسل نشان داده شده است. دواير نارنجی نشان‌دهنده زیرگروه‌های جدایه‌های ایرانی بیماری‌زای زردآلو و بادام و خطوط سیاه پررنگ در سمت راست نشان‌دهنده گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی می‌باشند. *Pss*: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Pf*: *Pseudomonas fluorescens*; *Ps*: *Pseudomonas syringae*.

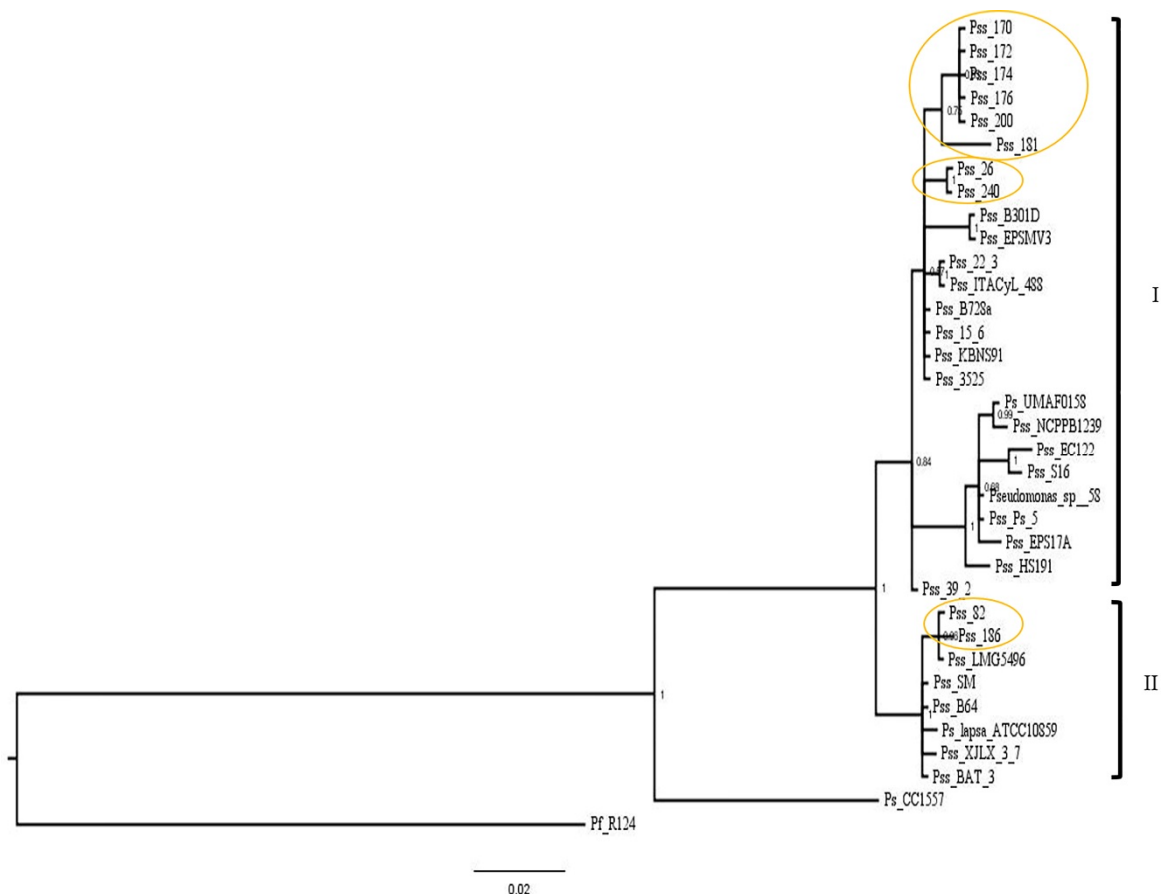
Fig 3. Bayesian inference phylogenetic tree was constructed for strains of *Pseudomonas syringae* based on aligned sequences of the *syrB* gene (645 nucleotides) using HKY+G model. The scale bar represents the average number of substitutions per site, and posterior probability values are shown at the nodes obtained for 10000000 generations. Orange circles show apricot and almond pathogenic strains and the bold black lines in right show the grouping of the strains. *Pss*: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; *Pf*: *Pseudomonas fluorescens*; *Ps*: *Pseudomonas syringae*.

درختان زردآلو و بادام در مناطق نمونه‌برداری شده استان آذربایجان شرقی به عنوان قطب کشت این محصولات باغی، هدف تحقیق حاضر مبتنی بر بررسی ارتباط این علائم با جدایه‌های بیماری‌زای *Pss* و بررسی گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و ژنتیکی پایه‌گذاری گردید. در میان درختان نمونه‌برداری شده با علائم مشخصه شانکر باکتریایی درختان میوه

شدند. زیر گروه اول شامل جدایه‌های Pss-170، Pss-172، Pss-174، Pss-176، Pss-181، Pss-200 و زیر گروه دوم شامل جدایه‌های Pss-240 و Pss-26 بود. جدایه‌های Pss-82 و Pss-186 در گروه II قرار گرفتند (شکل ۴).

بحث

به دلیل وسعت علائم شانکر همراه با ترشح صمغ در



شکل ۴. تبارنمای ترسیم شده برای جدایه‌های *Pseudomonas syringae* براساس ترادف‌های هم‌تراز ژن *rpoD* (۵۳۱ نوکلئوتید) با روش Bayesian inference و مدل HKY+G. خط مقیاس نشان دهنده میانگین تعداد جایگزینی‌ها در هر محل می‌باشد. بر روی هر گره احتمال پسین به دست آمده از ۱۰۰۰۰۰۰۰ نسل نشان داده شده است. دایره نارنجی نشان‌دهنده زیرگروه‌های جدایه‌های ایرانی بیماری‌زای زردآلو و بادام و خطوط سیاه پررنگ در سمت راست نشان‌دهنده گروه‌بندی جدایه‌های ایرانی می‌باشند. Pss: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Pf: *Pseudomonas fluorescens*; Ps: *Pseudomonas syringae*.

Fig 4. Bayesian inference phylogenetic tree was constructed for strains of *Pseudomonas syringae* based on aligned sequences of the *rpoD* gene (531 nucleotides) using HKY+G model. The scale bar represents the average number of substitutions per site, and posterior probability values are shown at the nodes obtained for 10000000 generations. Orange circles show apricot and almond pathogenic strains and the bold black lines in right show the grouping of the strains. Pss: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Pf: *Pseudomonas fluorescens*; Ps: *Pseudomonas syringae*.

و زردآلو، جدایه‌های *Pss* شناسایی شدند. کاربرد دو روش جداسازی به افزایش احتمال جداسازی جدایه‌ها کمک شایانی نمود. اکثر جدایه‌های *Pss* به صورت رورستی جداسازی شدند. در پنج درصد درختان نمونه برداری شده، جدایه‌های *Pss* به هر دو حالت رورستی و درون-رستی از نمونه‌ها جداسازی گردیدند. اما در کل به دلیل

هسته‌دار، از جمله شانکر و خروج صمغ از تنه و شاخه و بلاست شکوفه، تنها خصوصیات پنج درصد از جدایه‌های باکتریایی جداسازی شده، بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی با خصوصیات *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Palleroni 1984) در ۵۴ درصد مناطق نمونه‌برداری شده، عامل بیماری شانکر بادام

گزارش کردند که جدایه‌های *Pss* جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار (هلو، شلیل، زردآلو، آلو و گیلاس) در مناطق مختلف استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی از درجات بیماری‌زایی مشابه و بالایی روی ساقه نهال‌های هلو برخوردار بوده به طوری که تشکیل زخم‌های بافت‌مرده فرورفته همراه با ترشح صمغ توسط جدایه‌ها مشاهده گردید.

جدایه‌های بیمارگر در مهار رشد رویشی قارچ *G. candidum* تفاوت داشتند. نتایج فوق با یافته‌های مطالعات محققان اوتا و انگلیس (Otta & English 1971)، گروس و همکاران (Gross et al. 1984) و محمودی و همکاران (Mahmoudi et al. 2011) مطابقت داشت. بعلاوه همبستگی بین مهار رشد رویشی قارچ و بیماری‌زایی جدایه‌ها وجود نداشت. به طوری که جدایه‌هایی با اعمال بیشترین بازدارندگی علیه قارچ، علایم بافت‌مرده خفیفی را در آزمون بیماری‌زایی نشان دادند. خو و گروس (Xu & Gross 1988) گزارش کردند که تولید زهرابه سیرینگومایسین توسط جدایه‌های *Pss* عامل مهمی در پرآزاری بیمارگر بوده ولی عامل اصلی در بیماری‌زایی نمی‌باشد. باکا و همکاران (Baca et al. 1987) اعلام کردند که جدایه‌های غیربیماری‌زای *P. syringae* که روی برگ‌های توتون علایم فوق حساسیت ایجاد نمی‌کنند اغلب در طبیعت به حالت رورستی بوده و برخی از این جدایه‌ها قادر به تولید سیرینگومایسین می‌باشند (Gross & DeVay 1977b, Gross et al. 1984). از این رو پیشنهاد گردید که ژن‌های دخیل در سنتز و ترشح سیرینگومایسین در جدایه‌های *Pss* و جدایه‌های غیربیماری‌زای رورستی وابسته به آن، ژن‌هایی ضروری و مهم می‌باشند هر چند که برخی از جدایه‌ها ممکن است در غیاب مولکول‌های سیگنال گیاهی قادر به تولید زهرابه نباشند (Quigley & Gross 1994).

پایین بودن تعداد جدایه‌های *Pss* جداسازی و شناسایی شده علی‌رغم وسعت آلودگی منطقه، احتمال دخیل بودن سایر عوامل باکتریایی و حتی قارچی در بروز علایم شانکر و ترشح صمغ بر روی درختان زردآلو و بادام در مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد. بیماری با عامل *Pss* در برخی باغ‌های درختان میوه هسته‌دار در استان‌های مختلف ایران شناسایی و گزارش شده است (Al-e-Yasine & Banihashemi 1993, Ghasemi et al. 1998, Najafi Pour & Taghavi 2001, Mosivand et al. 2009, Abbasi et al. 2013).

جدایه‌های به دست آمده از لحاظ خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی اختلافات بسیار جزیی داشته و تنوعی در میان جدایه‌ها نمایان نشد. نتایج این آزمون‌ها با مطالعات انجام شده توسط جونز و همکاران (Jones et al. 1993) و الداغی و همکاران (Aldaghi et al. 2010) مطابقت داشت. با این حال جدایه‌ها در آزمون فوق حساسیت علایم متفاوت شامل زخم‌های بافت‌مرده و آب‌سوخته غیرقابل برگشت را نشان دادند. کیگلی و گروس (Quigley & Gross 1994) گزارش کردند که علی‌رغم بیماری‌زا بودن جدایه‌های *Pss*، زخم‌های بافت‌مرده در واکنش فوق حساسیت ظاهر نشد. در آزمون بیماری‌زایی، جدایه‌ها درجات مختلفی از پرآزاری را نشان دادند. در این آزمون جدایه‌هایی که باعث بروز زخم‌های آب‌سوخته در آزمون فوق حساسیت شده بودند نسبت به جدایه‌های القای کننده HR، در آزمون بیماری‌زایی روی سرشاخه‌های بریده زردآلو زخم‌های بافت‌مرده سطحی‌تر و کم عمق‌تری را تشکیل دادند. محمودی و همکاران (Mahmoudi et al. 2011) در آزمون بیماری‌زایی، طول زخم‌های بافت‌مرده ایجاد شده توسط جدایه‌های *Pss* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان را روی شاخه‌های هلو متغیر گزارش کردند. عباسی و همکاران (Abbasi et al. 2013)

شبهات میان ۲۷ جدایه *P. syringae* مورد مطالعه را ۹۴ درصد گزارش کردند. در تحقیق حاضر بر اساس بررسی ماتریس تشابه ترادف ۷۱۷ نوکلئوتیدی ژن *syTB*، شبهات میان جدایه‌ها ۱۰۰-۹۱/۶ درصد محاسبه گردید. بررسی خوشه‌ای جدایه‌ها بر پایه روش بایزین نشان داد که در میان جدایه‌ها تنوع ژنتیکی بالایی بر اساس ژن سنتز کننده زهرابه سیرینگومایسین وجود دارد و بر این اساس جدایه‌ها به دو گروه کاملاً مجزای I و II تقسیم شدند. در میان جدایه‌های *Pss* به دست آمده از یک منطقه نیز تنوع وجود داشته به طوری که جدایه‌های سردرود حداکثر تمایز را نشان داده و در گروه‌های متمایز قرار گرفتند. در میان جدایه‌های گروه I نیز تنوع وجود داشته و جدایه‌ها در زیرگروه‌های مجزا قرار گرفتند. با این حال جدایه‌های ایرانی قرار گرفته در گروه I از جدایه‌های مرجع واقع در گروه I مجزا شده و در خوشه متمایزی قرار گرفتند. جدایه بادام جدا شده از منطقه سردرود، بیشترین نزدیکی را به جدایه‌های به دست آمده از زردآلو در منطقه سپیدان نشان داد. در دندروگرام ترسیم شده بر اساس ژن *syTB*، همبستگی بین تولید سیرینگومایسین در آزمایشگاه و مهار رشد رویشی قارچ ژئوتریکوم، بروز نوع علائم در آزمون فوق حساسیت روی برگ‌های توتون و بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سرشاخه‌های بریده زردآلو وجود نداشت. کیگلی و گروس (Quigley & Gross 1994)، سورنسن و همکاران (Sorensen et al. 1998) و ناتالینی و همکاران (Natalini et al. 2006) با استفاده از تکنیک RFLP محصولات ژن *syTB* به بررسی تنوع میان جدایه‌های *Pss* پرداخته و جدایه‌ها را گروه‌بندی کردند. نتایج به دست آمده در تحقیقات مذکور مشابه بوده و نتایج همدیگر را حمایت می‌کنند.

توپوگرافی دندروگرام ترسیم شده بر اساس ژن *rpoD*

در بسیاری از مطالعات انجام شده، شبهات جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و حتی الگوی پروتئینی محققان را به سوی استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR که ثبات و کارایی لازم برای گروه‌بندی و تعیین روابط تبارزایی میان جدایه‌های باکتریایی موجود در یک گروه را دارا هستند، ترغیب نموده است (de Bruijn et al. 1996). از جمله می‌توان به روش‌های مبتنی بر انگشت‌نگاری DNA با استفاده از ترادف‌های تکرارشونده مانند rep-PCR (Kaluzna et al. 2010, Abbasi et al. 2013)، بررسی تنوع جدایه‌ها با نشانگر-های RAPD، RFLP (Legard et al. 1993; Natalini et al. 2006, Dariush et al. 2012, Gutiérrez-Barranquero et al. 2013) و بررسی گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس MLST (Martín-Sanz et al. 2013, Ravindran et al. 2015, Słomnicka et al. 2015)، اشاره نمود. خوشه ژنی سیرینگومایسین از دو چهارچوب خوانش باز (ORF) تشکیل شده است که دو پروتئین SyTB1 به وزن ۶۷ کیلودالتون و SyTB2 به وزن ۳۶ کیلودالتون را کد می‌کند (Zhang et al. 1995, Guenzi et al. 1998). ژن *syTB* در میان جدایه‌های *Pss* حفاظت شده می‌باشد. از آنجایی که این ژن در سنتز لیپودپسی‌نوناپتیدهای حلقوی نقش دارد به عنوان ابزار مناسبی برای شناسایی تولیدکنندگان این زهرابه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تفاوت در ترادف نوکلئوتیدهای این ژن محققان را بر آن داشته است تا با استفاده از این خصوصیت به شناسایی و گروه‌بندی جدایه‌های تولید کننده زهرابه‌های لیپودپسی‌پتیدهای حلقوی بپردازند (Quigley & Gross 1994, Zhang et al. 1995, Sorensen et al. 1998).

سورنسن و همکاران (Sorensen et al. 1998) با مقایسه ترادف ۴۰۰ نوکلئوتیدی محصولات ژن *syTB*،

حاصل از بررسی دندروگرام‌های به‌دست آمده در تحقیق حاضر و شباهت گروه‌بندی جدایه‌های *Pss* بر اساس ژن-های *rpoD* و *syrB*، می‌توان در مطالعات اولیه همه-گیرشناسی بیماری که نیاز به گروه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف *Pss* دارد، در کنار تعیین ترادف ژن‌های خانه‌زاد، جدایه‌ها را بر پایه تعیین ترادف ژن حفاظت شده دخیل در تولید زهرابه سیرینگومایسین و مرتبط با پراآزاری بیمارگر، گروه‌بندی و مقایسه نمود. در این زمینه استفاده از تعداد بیشتری از جدایه‌های جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف جغرافیایی پیشنهاد می‌گردد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز به دلیل ارسال جدایه قارچی *G. candidum* سپاس‌گزاری می‌نمایند. این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران جوان ایران با گرنت شماره ۹۳۰۰۵۰۴۳ به انجام رسیده است.

اختلاف جزئی با توپوگرافی دندروگرام حاصله از ژن *syrB* داشت. به‌طرز جالبی پراکندگی جدایه‌ها در گروه‌های I و II بر اساس ژن‌های *syrB* و *rpoD* شبیه هم به‌دست آمد. به‌طوری که تمامی جدایه‌های به‌دست آمده از عجبشیر، میانه، سپیدان و سردرود (به‌جز یک جدایه) در گروه I و جدایه‌های به‌دست آمده از مرند و سردرود (یک جدایه) در گروه II قرار گرفتند. همچنین هیچ‌گونه همبستگی بین گروه‌بندی جدایه‌ها، مناطق جغرافیایی و میزبان وجود نداشت. پارکینسون و همکاران (Parkinson *et al.* 2011) با استفاده از تعیین ترادف ژن *rpoD* در میان ۶۷ استرین تیپ *P. syringae*، این ژن را به عنوان ابزاری مناسب و کارآمد برای شناسایی و ردیابی آزمایشگاهی جدایه‌های *P. syringae* معرفی کردند. کارایی این ژن قبلاً توسط سرکار و گتمن (Sarkar & Guttman 2004) به-عنوان یکی از هفت ژن مورد استفاده در بررسی‌های MLST در گروه‌بندی جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه قرار گرفته است. از این رو با توجه به دقت و کارایی ژن *rpoD* در گروه‌بندی جدایه‌های *P. syringae* و با استناد بر نتایج

منابع

- Abbasi V. Rahimian H. and Tajick-Ghanbari M. A. 2013. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal of Plant Pathology* 135: 225–235.
- Agrios G. N. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition, Elsevier Academic Press, London, UK, 948 pp.
- Ahmadi K. Gholizadeh H. Ebadzadeh H. Hatami F. Hoseinpoor R. Kazemifar R. and Abdshah H. 2016. *Agricultural statistics in 2015*. Ministry of Agriculture, Department of Planning and Economy, Center for Information and Communication Technology, Tehran, Iran. 3, 240.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19:716 – 723.
- Aldaghi M. Rahimian H. and Mohammadi M. 2010. Comparison of phenotypic, serological and molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of bacterial canker of stone fruits and blight of cereals. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45:91-93 (In Persian with English summary).
- Al-e-Yasine S. K. and Banihashemi Z. 1993. Bacterial Canker of Stone Fruit in Fars province. *Proceeding of the 11th Iranian Plant Protection Congress*. Rasht, Iran: 216.

- Arrebola, E. 2004. Caracterización de una nueva toxina producida por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: mangotoxina. Biosíntesis y papel en la patogénesis. Ph.D. thesis. University of Málaga, Málaga, Spain.
- Baca S. Canfield M. L. and Moore L. W. 1987. Variability in ice nucleation strains of *Pseudomonas syringae* isolated from diseased woody plants in Pacific Northwest nurseries. *Plant disease* 71:412-415.
- Bahar M. Mojtahedi H. and Akhyani A. 1982. Bacterial canker of apricot trees in Esfahan. *Iranian Journal of Plant Pathology* 18:58-67.
- Barzic M. R. and Guittet E. 1996. Structure and activity of persicomycins, toxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *Prunus persica* isolate. *European Journal of Biochemistry* 239: 702-709.
- Bender C. L. Chaidez A. and Gross D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:266-292.
- Bradbury J. F. 1986. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In: *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Kew, England: CAB International Mycological Institute, 175-177.
- Berge O. Monteil C. L. Bartoli C. Chandeysson C. Guilbaud C. Sands D. C. Morris C. E. 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*. 9: e105547.
- Bull C. T. Clarke C. R. Cai R. Vinatzer A. B. Jardini T. M. and Koike S. T. 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* Sensu Lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 10:847-858.
- Bultreys A. and Gheysen I. 1999. Biological and molecular detection of toxic Lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1904-1909.
- Carrión V. J. van der Voort M. Arrebola E. Gutiérrez-Barranquero G. A. de Vicente A. Raaijmakers J. M. and Cazorla F. M. 2014. Mangotoxin production of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is regulated by MgoA. *BMC Microbiology* 14:46.
- Cazorla F. M. Arrebola E. Del Moral E. Rivera E. Olea F. Perez-Garcia A. and De Vicente A. 2003. An antimetabolite toxin (mangotoxin) is produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango. Pages 175-183 in: *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. N. S. Iacobellis, A. Collmer, S. W. Hutcheson, C. E. Morris, J. Murillo, N. W. Schaad, D. E. Stead, G. Surico, and M. S. Ullrich, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dariush S. Ebadi A. A. Khoshkdaman M. Rabiei B. and Elahinia A. 2012: Characterising the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from rice and wheat in Iran. *Plant Protection Science* 48:162-169.
- De Bruijn, F. J. Rademaker J. Schneider M. Rossbach U. and Louws F. J. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. Pp. 497-502. In: Grey S. Beth M. and Peter M. G (Eds.), *Biology of Plant-Microbe Interaction*. V. 1, APS Press, USA.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue *Focus* 12:13-15.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Endert E. and Ritchie D. F. 1984. Detection of pathogenicity, measurement of virulence and determination of strain variation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Disease* 68:677-680.
- Fahy P. C. and Parsley G. J. 1983. *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. Academic Press. Sydney, Australia. 393.
- Ferrante P. and Scottichini M. 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology* 59:954-962.
- Fujita M. Hanaura Y. and Amemura A. 1995. Analysis of the *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. *Gene* 167:93-98.
- Gardan L. Shafik H. Belouin S. Broch R. Grimont F. and Grimont P. A. D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:469-478.

- Ghasemi A. Mohammadi M. Rahimian H. Sharifi Tehrani A. and Zakiee Z. 1998. Study of bacterial canker agent of stone fruit in Karaj. *Proceeding of the 13th Iranian Plant Protection Congress*, Karaj, Iran: 251.
- Grgurina I. Gross D. C. Iacobellis N. S. Lavermicocca P. J. Takemoto Y. and Benincasa M. 1996. Phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: syringopeptin production by syr mutants defective in biosynthesis or secretion of syringomycin. *FEMS Microbiology Letters* 138:35–39.
- Gross D. C. and DeVay J. E. 1977a. Population dynamics and pathogenesis of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. *Phytopathology* 67:475-483.
- Gross D. C. and DeVay J. E. 1977b. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiological Plant Pathology* 11:12-28.
- Gross D. C. Cody Y. S. Proebsting E. L. Rademaker G. K. and Spotts R. R. 1984. Ecotypes and pathogenicity of ice-nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology* 74:241-248.
- Guenzi E. Galli G. Grgurina I. Gross D. C. and Grandi G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster—a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry* 273:32857-63.
- Guenzi E. Galli G. Grgurina I. Gross D. C. and Grandi G. 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster—a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases, *Journal of Biological Chemistry* 273:32857– 32863.
- Gutiérrez-Barranquero J. A. Carrión V. J. Murillo J. Arrebola E. Arnold D. L. Cazorla F. M. and de Vicente A. 2013. A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology*. 103:1115-29.
- Hattingh M. J. and Roos I. M. M. 1995. Bacterial Canker. *Compendium of stone fruit diseases*, by Ogawa J. M. and Zehr E. I. APS Press. 48-50.
- Hutchison M. L. and Gross D. C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:347–354.
- Hwang M. S. H. Morgan R. L. Sarkar S. F. Wang P. W. and Guttman D. S. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5182–5191.
- Ichinose Y. Taguchi F. and Mukaihara T. 2013. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *Journal of General Plant Pathology* 79:285–296.
- Jones A. L. 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Report* 55:961-965.
- Jones J. B. Chase A. R. and Harris G. K. 1993. Evaluation of the Biology GN Microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Disease* 77:553–558.
- Kaluzna M. Ferrante P. Sobiczewski P. and Scortichini M. 2010. Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology* 92:781–787.
- Kaluzna M. Janse J. D. and Young J. M. 2012. Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts *Pseudomonas syringae* pathovars. *Journal of Plant Pathology* 94: S1.117-S1.126.
- Klement Z. Frakes G. L. and Lovrekovich L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54:74-477.
- Latorre B. A. and Jones A. L. 1979. *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69: 335-339.
- Legard D. E. Aquadro C. F. and Hunter J. E. 1993. DNA sequence variation and phylogenetic relationships among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* inferred from restriction site maps and restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 59:4180–4188.
- Lelliott R. A. and Stead D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Preece TF, ed. *Methods in Plant Pathology*. London, UK: Blackwell Scientific Press. 2, 216.
- Lelliott R. A. Billing E. and Hayward A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29:470-489.

- Lonetto M. Gribskov M. and Gross C. A. 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology* 174:3843-3849.
- Mahmoudi H. Rahnama K. Rahimian H. Nasrolahnejad S. and Taghinasab M. 2011. Investigation on casual and associated agents with bacterial canker stone fruit trees in Golestan province. *Journal of Plant Production* 18:73-80.
- Martín-Sanz A. de la Vega M. P. Murillo J. and Caminero C. 2013. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. *Phytopathology* 103:673-81.
- 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.
- Misas-Villamil J. C. Kolodziejek I. Crabill E. Kaschani F. Niessen S. Shindo T. Kaiser M. Alfano J. R. and van der Hoorn R. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Uses proteasome inhibitor syringolin a to colonize from wound infection sites. *PLOS Pathogens* 9:e1003281.
- Mohammadi M. Ghasemi A. and Rahimian H. 2001. Phenotypic characterization of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, the causal agent of bacterial canker disease of stone fruit trees. *Journal of Agricultural Science and Technology* 3: 51-65.
- Mosivand M. Rahimian H. and Shams-Bakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruit and wheat. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45:75-85.
- Mulet M. Lalucat J. and García-Valdés E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12:1513-1530.
- Najafi Pour G. and Taghavi S. 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.
- Natalini E. Rossi M. P. Barionovi D. and Scortichini M. 2006. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. *Journal of plant pathology* 88:219-223.
- Nowell R. Laue B. Sharp P. M. and Green S. 2016. Comparative genomics reveals genes significantly associated with woody hosts in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant pathology* 17:1409-1424.
- Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest v2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Otta J. D. and English H. 1971. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 61:443-452.
- Palleroni N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* (Migula 1984), Pp. 141-199. In: Holt J. G. and Kreig N. R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
- Parkinson N. Bryant R. Bew J. and Elphinstone J. 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathology* 60:338-344.
- Quigley N. and Gross D. C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:78-90.
- Rannala B. and Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43:304-311.
- Ravindran A. Jalan N. Yuan J. S. Wang N. and Gross D. C. 2015. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains B301D and HS191 and insights into intrapathovar traits associated with plant pathogenesis. *Microbiologyopen* 4:553-573.
- Ronquist F. Teslenko M. van der Mark P. Ayres D. L. Darling A. Höhna S. Larget B. Liu L. Suchard M. A. and Huelsenbeck J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.
- Sánchez D. Matthijs S. Gomila M. Tricot C. Mulet M. Garcia-Valdés E. and Lalucata J. 2014. *rpoD* gene Pyrosequencing for the assessment of *Pseudomonas* diversity in a water sample from the Woluwe river. *Applied and Environmental Microbiology* 80:4738-4744.
- Sands D. C. Scoth M. N. and Hildebrand D. C. 1970. Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* 101:9-23.

- Sarkar S. F. and Guttman D. S. 2004. The 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. and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. 373.
- Schellenberg B. Ramel C. and Dudler R. 2010. *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:1287–1293.
- Sinden S. L. DeVay J. E. and Backman P. A. 1971. Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin production by *Pseudomonas syringae*, and its role in bacterial canker disease of peach trees. *Physiological Plant Pathology* 1:199-214.
- Słomnicka R. Olczak-Woltman H. Bartoszewski G. and Niemirowicz-Szczytt K. 2015. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* strains isolated from cucurbits. *European Journal of Plant Pathology* 141:1–14.
- 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* 64:226–230.
- Tamura K. Stecher G. Peterson D. Filipowski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.
- Wang N. Lu S. E. Yang Q. Sze S. H. and Gross D. C. 2006. Identification of the syr-syp box in the promoter regions of genes dedicated to syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Journal of Bacteriology* 188:160-168.
- Xu G. W. and Gross D. C. 1988. Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* defective in syringomycin production. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1345–1353.
- Yamamoto S. Ksai H. Arnold D. L. Jackson R. W. Vivian A. and Harayama S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394.
- Young J. M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Biology Journal* 118:283–298.
- Young J. M. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92, S1.5–S1.14.
- Zhang J. H. Quigley N. B. and 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.
- Zhang J. H. Quigley N. B. and Gross D. C. 1997. Analysis of the *syrP* gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2771–2778.