

ارزیابی برخی از فاکتورهای بیماریزایی و مرتبط با پرآزاری استرین‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* در استان خراسان رضوی

اسماء رحمان‌زاده^۱، ساره بقایی راوری^۲ و عصمت مهدیخانی مقدم^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۹)

چکیده

باکتری (*Xap*) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* عامل لکه روی برگ، میوه و شانکر باکتریایی شاخه در شرایط گرم و مرطوب روی درختان میوه‌هسته دار می‌باشد. در تحقیق حاضر، بیماریزایی ۱۸ استرین *Xap* خراسان رضوی در شرایط گلخانه روی نهال‌های آلوی ساتاروزا بررسی شد. تعدادی از فاکتورهای بیماریزایی شامل پلاسمید pXap41، افکتورهای اختصاصی تیپ III ترشحی و همچنین تعدادی ویژگی دخیل در پرآزاری از جمله تحرک، تولید بیوفیلم، زانتان، بیوسورفکتانت، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و ارتباط احتمالی آنها با میزان بیماریزایی استرین‌ها بررسی شدند. براساس درصد لکه‌های نکروز، استرین‌ها در دو گروه بیماریزایی قوی و ضعیف قرار گرفتند. تمامی ۱۸ استرین مورد مطالعه به همراه استرین استاندارد ICMP7485، پلاسمید pXap41 و ژن‌های افکتوری اختصاصی *xopE3* و *xopA* را دارا بودند. در برخی موارد بین شدت بیماریزایی استرین‌ها و فاکتورهای دخیل در پرآزاری ارتباط مستقیم وجود داشت. برای مثال دو استرین NB28k و ShL45 با بالاترین درصد لکه‌های نکروز (۶۲/۵ درصد)، بیوسورفکتانت و بیوفیلم بیشتری تولید نمودند و اختلاف معنی‌داری با سایر استرین‌ها در سطح احتمال پنج درصد نشان دادند. به نظر می‌رسد زانتان در پرآزاری استرین‌های *Xap* نقش موثری نداشته باشد. میزان حرکت توده‌ای در ۹۲/۳ درصد جدایه‌های گروه بیماریزایی قوی، بیشتر از حرکت شناوری بود ($P \leq 0/05$). همچنین، تمامی استرین‌ها قدرت ترشح آنزیم‌های پروتئاز، سلولاز، پلی‌گالاکتوروناز و پکتات‌لیاز را با مقادیر متفاوت داشته اما میزان ترشح همه آنزیم‌ها با پرآزاری استرین‌ها همخوانی کامل نداشت. برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر، ارزیابی استرین‌های *Xap* بیشتر از مناطق مختلف کشور به همراه سایر پاتووارهای گونه *X. arboricola* پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه: پرآزاری، *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*، pXap41

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

Evaluation of some pathogenicity and virulence factors in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains from Khorasan-Razavi Province

A. Rahmazadeh¹, S. Baghaee-Ravari^{2*}, and E. Mahdikhani-Moghaddam³

(Received: 14.5.2019; Accepted: 17.4.2020)

Abstract

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Xap) is a causal agent of leaf, fruit spot, and branch bacterial canker in warm and humid conditions on stone fruit trees. Herein, the pathogenicity of 18 Xap strains from Khorasan-Razavi Province, Iran was evaluated in greenhouse trials on Santha-Rosa plum saplings. Some pathogenicity factors including pXap41, T3SS effectors, and virulence features such as motility, biofilm, xanthan and biosurfactant production, cell wall degrading enzymes and their possible correlation with pathogenicity rate were investigated. The studied strains were divided into two severe and weak pathogenicity groups based on percentage of necrotic lesions. All 18 strains besides ICMP7485, had pXap41, *xopE3* and *xopA* effector genes. In some cases, there was a direct correlation between disease severity and factors involving in virulence. For example, two strains, ShL45 and NB28k, showed the highest percentage of necrosis spots (62.5%), produced high levels of biosurfactant and biofilm that indicated significant differences with other strains at 5% probability levels. It seems that xanthan has no significant effective role in Xap virulence. The rate of swarming in 92.3 % of strains belonging to the severe pathogenicity group was more than the swimming ($P \leq 0.05$). All strains were also capable of secreting different amounts of enzymes, including protease, cellulase, polygalacturonase, and pectatelyase. However, the rate of secretion in all them was not entirely consistent with virulence. It is suggested that more Xap strains from different regions of the country, along with other *X. arboricola* pathovars, should be tested to get results that are more accurate.

Keywords: Plasmid pXap41; Virulence; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

*Corresponding author's E-mail: s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir

1. Graduated MSc. Student, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Associate Professor, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Professor, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

مقدمه

شیمیوتاکسی به منظور ورود باکتری به داخل گیاه انجام و متعاقب پیشرفت بیماری، سایر فاکتورهای دخیل در بیماریزایی از جمله آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و افکتورهای ممانعت‌کننده دفاع گیاه، نقش مهمی در ایجاد شرایط محیطی مناسب به منظور استقرار جمعیت باکتریایی ایفا می‌کنند (Garita-Combrono et al. 2018).

تابه امروز ژنوم ۲۹ استرین از گونه *X. arboricola* توالی‌یابی شده است (Garita-Combrono et al. 2018). همچنین فاکتورهای بیماریزایی بالقوه مرتبط با توسعه لکه‌باکتریایی روی هسته‌داران شناسایی شده‌اند (Garita-Combrono et al. 2016, 2017, Hajri et al. 2012). جنس زانتوموناس بیان همزمان فاکتورهای بیماریزایی از جمله تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی، تحرک و تشکیل بیوفیلم به همراه تولید آنزیم‌های خارج سلولی و ورود باکتری به آپوپلاست به واسطه روزنه، تحت کنترل سیستم حدنصاب احساس (Quorum sensing) می‌باشد (Buttner et al. 2010). در گونه *X. arboricola* سیگنال‌های شیمیوتاکسی مرتبط با تحرک باکتریایی بوده و کنترل جهت حرکت موتور تاژک را به عهده داشته (Scharf et al. 2016) که به همراه چسبنده‌ها و ساختارهای بیوفیلم احتمالاً نقش‌های کلیدی در استقرار ابتدایی جمعیت باکتریایی در گیاه ایفا می‌نمایند (Cesbron et al. 2015, Garita-Combrono et al. 2016, Jacques et al. 2016).

بیوفیلم نیز به عنوان یک فاکتور بیماریزایی در مراحل اولیه کلونیزاسیون میزبان توسط باکتری تولید و با تجمع باکتری‌ها باعث محافظت و اتصال راحت‌تر آنها به سطوح مختلف می‌شود (Costerton et al. 1995). زانتان به عنوان پلی‌ساکارید مرتبط با بیماریزایی در اتصال باکتریایی و تولید بیوفیلم در بیشتر اعضای Xanthomondaceae نقش

گونه *Xanthomonas arboricola* دربرگیرنده یک گروه باکتریایی با اختصاصیت میزبانی بالا می‌باشد (Essakhi et al., 2015). در بین نه پاتووار متعلق به گونه *X. arboricola* سه پاتووار *pruni*, *corylina* و *juglandis* شدت بیماریزایی و اهمیت اقتصادی بالایی دارند (Fischer et al. 2015). پاتووارهای *pruni* و *corylina* به عنوان بیمارگرهای قرنطینه‌ای در بسیاری از کشورها و از جمله اتحادیه اروپا هستند (EFSA 2014). شرایط گرم و مرطوب به تکثیر باکتری کمک کرده (Moreles et al. 2017) و باعث بروز لکه روی برگ، میوه و شانکر باکتریایی شاخه می‌گردد (EFSA 2014, Stefani 2010). بیماری لکه‌باکتریایی به جهت کاهش کیفیت و بازارپسندی میوه، کاهش تولید محصول و افزایش هزینه‌های احداث نهالستان دارای اهمیت اقتصادی است و منجر به خسارت در باغ‌های تجاری هسته‌دار آلو، زردآلو، هلو، گیلاس، آلبالو و بادام در دنیا می‌شود (Stefani 2010). در ایران اولین بار بیماری شانکر باکتریایی روی درختان زردآلو در اصفهان گزارش و میزان خسارت ناشی از آن ۵۰-۲۲ درصد برآورد شد (Bahar et al. 1985).

باکتری *X. a. pv. pruni* (Xap) در جوانه‌های غیرفعال آلوده، زخم‌های برگ، شانکرها و بقایای برگ‌های ریخته‌شده در پای درخت به عنوان منابع مهم بقا و انتشار بیمارگر، زمستان‌گذرانی می‌کند (Zaccardelli et al. 1998). بیماریزایی Xap به واسطه تماس سلول‌های باکتریایی با سطح گیاه آغاز می‌شود و در این زمان فرآیندهای مختلف مرتبط با بیماریزایی شامل حس کردن شرایط محیطی توسط باکتری، چسبیدن باکتری به سطح، تشکیل ساختارهای بیوفیلم و تحرک مرتبط با پدیده

(Jami et al. 2005). درخشان و همکاران (۲۰۱۹) متعاقب بارندگی‌های فراوان در سال ۱۳۹۳، باکتری مذکور را از هسته‌داران خراسان رضوی جدا نموده و جمعیت Xap این استان را از نظر ژنتیکی با روشهای rep-PCR و توالی‌یابی ژن *gytB* بررسی نمودند. نتایج بررسی‌های مولکولی این گروه حاکی از تمایز ژنتیکی اندک بین استرین‌ها Xap در مناطق موردبررسی است (Derakhshan et al. 2019).

باتوجه به اهمیت فاکتورهای بیماریزایی در روند آلودگی و پرازاری Xap، مطالعه حاضر باهدف ارزیابی فاکتورهای مرتبط با بیماریزایی (پلاسمید pXap41، فاکتورهای اختصاصی تیپ III ترشچی) و پرازاری پاتووار Xap (تحرك، بیوفيلم، زانتان، بیوسورفکتانت، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی) و ارتباط احتمالی آن با میزان بیماریزایی استرین‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۹۳ از هسته‌داران خراسان رضوی انجام گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

استرین‌های باکتریایی

تعداد ۱۸ استرین انتخابی (*Xap*) *X. a. pv. pruni* خلاصه‌شده در جدول ۱ مربوط به باغ‌های هسته‌دار خراسان رضوی (Derakhshan et al. 2019) که از نظر فنوتیپی و مولکولی تاییدشده و در شرایط آزمایشگاهی روی برگ‌های آلو بیماریزا بودند، روی محیط کشت YDC (۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم کربنات کلسیم، ۲۰ گرم آگار) کشت شدند. استرین استاندارد ICMP7485 نیز از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید.

سنجش بیماریزایی استرین‌ها در شرایط گلخانه

به منظور شبیه‌سازی شرایط آلودگی Xap در حالت

دارد (Moreira et al. 2005). زانتان توانایی باکتری را در مقابل تنش‌های زیستی از جمله کم‌آبی افزایش داده و عدم تولید آن منجر به کاهش بقای باکتری در سطح بافت می‌شود (Rigano et al. 2007). بیوسورفکتانت نیز به پراکنش باکتری در سطوح گیاهی مختلف، افزایش بیوفيلم، ورود به داخل گیاه میزبان و ایجاد بیماری کمک می‌کند (Simoes et al. 2010).

به محض ورود باکتری به داخل بافت، طیفی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده و فاکتورها تولید می‌شوند که به تغییر در فیزیولوژی، متابولیسم و پاسخ‌های ایمنی گیاه منجر می‌شود. در گونه *X. arboricola* حداقل ۱۳ آنزیم سلولیتیک، ۱۳ آنزیم هموسلولتیک، یک آنزیم هیدرولاز، چهار آنزیم لیپاز، ۱۰ آنزیم پکتولیتیک و هفت آنزیم پروتئاز شناسایی شده است (Cesbron et al. 2015, Garita-). تمام ژن‌های ساختاری و تنظیمی کلاستر *hrp2* تیپ ترشچی III در Xap وجود داشته (Hajri et al. 2012)، ۱۹ فاکتور و پروتئین ترشچی را تولید نموده و از این تعداد، دو ژن فاکتور *xopE3* و *xopAQ* اختصاصی Xap می‌باشند (Garita-Cambronero et al. 2018). علاوه بر موارد ذکر شده، تمام استرین‌های بیماریزای Xap پلاسمیدی به نام pXap41 دارند که نقش مهمی در بیماریزایی باکتری و تکامل آن ایفا می‌کند و باعث تفکیک پاتووار Xap از سایر پاتووارهای گونه *X. arboricola* می‌شود (Pothier et al. 2011).

مطالعات مختلف در مورد نحوه تعامل باکتری Xap و میزبان و بررسی فاکتورهای مرتبط با بیماریزایی می‌توانند راهگشای توسعه راهکارهای کنترلی از جمله ممانعت از مکانیسم‌های مرتبط با بیماریزایی و شدت آن باشند (Garita-Cambronero et al. 2018). اولین گزارش ظهور این پاتووار در ایران در سال ۱۳۸۴ و از استان گیلان بود

جدول ۱. توان جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی از نظر تولید آنزیم‌های لیتیک (قطر هاله) و زانتان

Table 1. Potential of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains collected from Khorasan Razavi Province in terms of lytic enzymes (halo diameter) and xanthan production

نام جدایه Strain Name	پکتات لیاز Pectatelyase (cm)	پلی گالاکتوروناز Polygalactronase (cm)	پروتئاز Protease (cm)	سلولاز Cellulase (cm)	زانتان Xanthan (gr)
QB22	0.1 b±0.63	0.03 e±2.27	0.02 a±1.62	0.01 a±1.3	0.01 c±0.11
NB28	0.01 d±1.25	0.02 e±2.38	0.01 bcd±2.42	0.02 e±1.58	0.01 f±0.25
NB28K	0.01 ef±1.41	0.02 e±2.39	0.05 ef±2.89	0.02 j±1.97	0.01 e±0.20
ML41	0.01 b±0.64	0.02 e±2.39	0.03 ef±2.89	0.01 f±1.56	0.02 f±0.27
QB15	0.02 h±2.12	0.57 b±1.47	0.02 ced±2.60	0.01 cd±1.42	0.02 g±0.35
NB28b	0.01 f±1.43	0.02 de±2.22	0.01 ef±2.92	0.0 jk±2.10	0.02 d±0.17
ML37	0.1 b±0.63	0.03 e±2.36	0.02 fg±3.59	0.04 bc±1.39	0.004 b±0.08
TL39	0.03 g±1.43	0.02 e±2.48	0.04 bc±2.39	0.02 fg±1.67	0.003 bc±0.09
TB47	0.03d±1.26	0.02 e±2.38	0.02 bcd±2.41	0.02 a±1.33	0.01 bc±0.09
TB31	0.01 h±2.12	0.02 e±2.48	0.03 a±1.62	0.01 i±1.74	0.002 bc±0.09
TL49	0.02 a±0.57	0.02 a±1.32	0.02 bcd±2.40	0.01 bcd±1.40	0.01 bc±0.08
QB18	0.02 ef±1.42	0.02 de±2.26	0.04 bcd±2.42	0.02 b±1.38	0.005 b±0.08
SHB32	0.01 h±2.11	0.2 a±1.36	0.04 fg±3.27	0.02 bcd±1.40	0.01 bc±0.09
QB24	0.5 a±0.55	0.02 de±2.22	0.02 bcde±2.46	0.02 hi±1.72	0.005 b±0.08
CB19	0.01 e±1.39	0.02 e±2.48	0.03 bcd±2.42	0.0 gh±1.69	0.0 bc±0.09
SHL45	0.01 e±1.39	0.05 bc±2.06	0.03 bcde±2.44	0.01 bcd±1.41	0.01 bc±0.09
ML35	0.01 h±2.11	0.01 bc±1.88	0.03 fg±2.23	0.02 d±1.43	0.00 a±0.05
NB21	0.04 ef±1.42	0.0 f±3	0.02 ab±2	0.01 cd±1.42	0.00 a±0.05
ICMP7485	0.02 c±0.98	0.03 a±1.32	0.02 bcde±2.49	0.01 k±2.01	0.00 bc±0.09

داده‌ها میانگین سه تکرار در دو آزمایش مجزا است. ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

Data are the average of three replications in two separate tests. Columns with the same letters have no significant differences at the 5% probability level.

روش اول با استفاده از سرنگ بدون سوزن، مایه‌زنی تاجایی انجام گرفت که ورود سوسپانسیون در زیر پارانشیم برگ قابل‌رویت باشد و در روش دوم، در چند ناحیه بین رگبرگی با کمک سوزن خراش و یک قطره از سوسپانسیون باکتری جهت جذب در محل زخم‌ها گذاشته شد. در ابتدا نهال‌های تلقیح‌شده در زیر پوشش پلاستیکی آبپاشی شده با آب مقطرسترون به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفتند و سپس به گلخانه‌ای با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۸۵ درصد منتقل و به‌طور روزانه تا ۲۱ روز ارزیابی شدند. شدت بیماری به درصد، براساس تعداد

طبیعی، بیماری‌زایی ۱۸ استرین مورد مطالعه روی نهال‌های آلودی رقم سانتاروزا انجام گرفت. سوسپانسیون باکتریایی از کشت ۲۴ ساعته با غلظت 10^7 CFU/ml تهیه شد (سوسپانسیون باکتریایی با چگالی نوری متفاوت با استفاده از اسپکتروفتومتر تهیه و با رقیق‌سازی متوالی بر روی تشتک‌های پتری در ۴ تکرار کشت و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، کلنی‌های باکتری شمارش و برآورد جمعیت انجام شد) و مایه‌زنی در دو منطقه روی چهار برگ جوان و کاملاً رشدیافته دو نهال مختلف آلودی رقم سانتاروزا به دو روش انجام گرفت (Socquet-Juglard *et al.* 2012). در

دمایی در ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و ۳۰ چرخه که هر یک شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سیلسیوس، یک دقیقه در ۶۰ درجه سیلسیوس و دو دقیقه در ۷۲ درجه سیلسیوس و در نهایت بسط قطعه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس انجام گرفت (Hajri et al. 2012).

بررسی فاکتورهای دخیل در پرآزاری باکتری Xap

بدین منظور فاکتورهای تولید زانتان، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، بیوسورفاکتانت، بیوفیلیم و تحرک در استرین‌ها بررسی شدند. در تمام آزمون‌ها، استرین استاندارد ICMP7485 به‌عنوان کنترل مثبت و آب مقطرسترون به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. آزمون‌ها با سه تکرار و دوبار انجام شدند.

تولید زانتان

کشت استرین‌ها در محیط PYM (۵٪ درصد پیتون، ۳٪ درصد عصاره مخمر، ۳٪ درصد عصاره مالت) حاوی دو درصد گلوکز انجام شد. سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ، روشین حاصل با KCl یک درصد و دو حجم اتانول مخلوط و به مدت دو ساعت در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ مجدد، روشین حذف و ته‌نشین حاصل اندازه‌گیری شد (Vojnov et al. 1998).

تولید آنزیم‌های لیتیک

برای تمامی استرین‌ها، تولید آنزیم‌های پروتئاز (در محیط حاوی شیر کم‌چرب)، سلولاز (در محیط حاوی کربوکسی‌متیل سلولز) (Kasana et al. 2008)، پلی‌گالاکتوروناز و پکتات‌لیاز (در محیط حاوی

لکه‌های نکرور نسبت به کل نقاط مایه‌زنی شده در تکرارهای مختلف محاسبه شد. استرین استاندارد ICMP7485 و آب مقطرسترون به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج پلاسמיד pXap41 و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندتایی

به منظور استخراج پلاسמיד، کشت استرین‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محیط کشت NYGB (شامل ۳ گرم برلیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم برلیتر گلیسرول و ۵ گرم برلیتر باکتوپیتون) در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس انجام شد و جداسازی پلاسמיד طبق روش (Zhou et al. 1990) بود. جهت ردیابی پلاسמיד و تایید آن در استرین‌های مورد بررسی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندتایی بر مبنای آغازگرهای طراحی شده برای پلاسמיד (Pothier et al. 2011) انجام گرفت. مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط پی‌سی آرآماده رنگ قرمز شرکت امپلیکون، دو میکرولیتر DNA پلاسמידی به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول) در دستگاه ترمو سایکلر تولیدی بیومترا (آلمان) طبق برنامه حرارتی ارائه شده در مقاله پوتیور و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد (Pothier et al. 2011). فرآورده‌های حاصل به همراه نشانگر وزن مولکولی سه کیلوگفت‌باز (SMOBiO, Taiwan) در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شدند.

ردیابی ژن‌های افکتوری xopA و xopE3

به منظور ردیابی دو ژن افکتوری *XopA* و *XopE3*، مختص پاتووار Xap در استرین‌های مورد مطالعه، از آغازگرهای ارائه شده توسط حجری و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک چرخه

سانتریفوژ مجدد، به میزان یک تا دو میکرولیتر از رسوب حاصل در مرکز تشتک‌های PYM (حاوی ۵/۰ درصد پیتون، ۳/۰ درصد عصاره مخمر، ۳/۰ درصد عصاره مالت و یک درصد گلوکز و به ترتیب ۰/۵ و ۱/۵ درصد آگار برای حرکت توده‌ای و ناگهانی و MMA (K₂HPO₄ ۷/۰ درصد، NH₄ MgSO₄ ۷H₂O ۱/۰۰ درصد، KH₂PO₄ ۳/۰ درصد، (SO₄)₂ ۱/۰ درصد، سدیم سیترات ۰/۵/۰ درصد، گلیسرول ۲/۰ درصد و حاوی ۰/۳ درصد آگار برای حرکت شناوری قرار داده شد و تشتک‌ها در ۲۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. شعاع حرکت هر استرین بر اساس میلی‌متر در هر محیط به طور جداگانه اندازه‌گیری گردید (Garita-Cambronero et al. 2016).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۲ (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) انجام شد تفاوت گروه‌های آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس ارزیابی و میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال کمتر و مساوی پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج

بیماری‌زایی استرین‌های Xap مورد بررسی در شرایط گلخانه

لکه‌های آب‌سوخته در نقاط مایه‌زنی روی برگ‌های آلوده رقم سانتارزا دو تا سه هفته پس از مایه‌زنی با استرین‌های Xap، ابتدا به صورت کلروز و سپس نکروز مشاهده شدند. بیماری‌زایی بر اساس درصد لکه‌های نکروز ایجاد شده در نواحی مایه‌زنی شده در هر دو روش (شکل ۱) برآورد گردید. باتوجه به داده‌های حاصل، استرین‌های ML35, CB19, NB28b, NB28, NB21, ShL45, QB22

پلی‌گالاکترونیک‌اسید) (Garita-Cambronero et al. 2016) ارزیابی شد.

تولید بیوسورفاکتانت

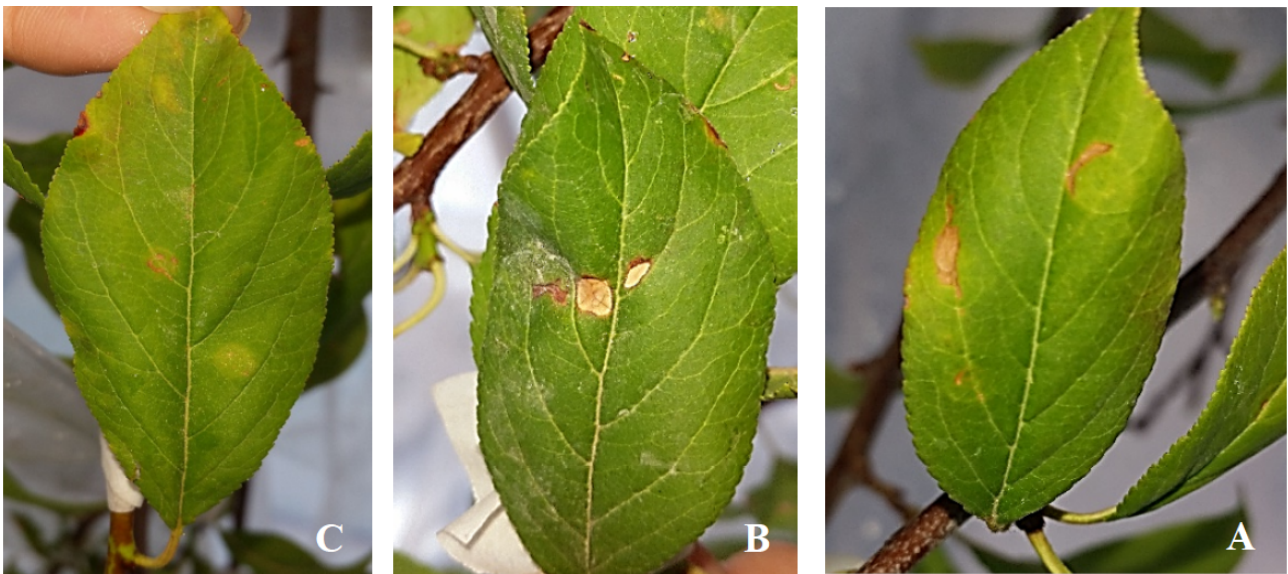
برای انجام این آزمون طبق روش پراکنش روغن (oil spread)، یک قطره روغن معدنی در سطح تشتک حاوی آب مقطر سترون چکانده و پنج میکرولیتر از روئشین سوسپانسیون باکتری (OD₆₀₀ = 1) در مرکز قطره روغن معدنی قرار گرفت. هاله تشکیل شده توسط استرین‌ها میان قطره روغن برای هر استرین اندازه‌گیری شد (Morikawa et al. 2000).

تولید بیوفیلم

از کشت ۷۲ ساعته باکتری در محیط PYM سوسپانسیونی با غلظت ۱۰^۷ CFU/ml تهیه و ۱۵۰ میکرولیتر درون چاهک‌های پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. شستشوی پلیت پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. متعاقب خشک شدن پلیت، میزان ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۳ درصد به چاهک‌ها اضافه و بعد از گذشت ۴۵ دقیقه، شستشوی مجدد انجام گرفت. با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط اتانول-استون با نسبت دو به یک، خوانش جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام شد (Guerra et al. 2018).

سنجش تحرک

سه نوع حرکت توده‌ای (Swarming)، شناوری (Swimming) و ناگهانی (Twitching) در استرین‌ها ارزیابی شدند (Garita-Cambronero et al. 2016). سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری سانتریفوژ و روئشین حذف شد. پس از شستشوی با کلرید منیزیم ده میلی‌مولار و



شکل ۱. بیماریزایی استرین *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*- NB28k از خراسان رضوی در شرایط گلخانه روی برگ های نهال آلوی رقم سانتاروزا. (A) مایه زنی با ایجاد خراش روی برگ؛ (B) مایه زنی با استفاده از سرنگ بدون سوزن؛ (C) آب مقطر استریل

Fig 1. Pathogenicity of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain NB28k from Khorasan-Razavi Province in green-house conditions on plum saplings leaves of Santa-Rosa cultivar, A) inoculation by scratching on the leaves; B) inoculating using a needle-less syringe; C) Sterile distilled water

وجود دارند، انجام گرفت. در تمامی استرین ها برای سه ناحیه مورد هدف در پلاسמיד شامل مناطق همانندسازی (*repA1* و *repA2*) و جابه جایی (*mobC*)، قطعاتی در محدوده ۲۴۵ و ۴۵۱، ۳۴۳ جفت باز تکثیر شد که دلالت بر وجود پلاسמיד در استرین ها دارد (شکل ۳). همچنین کلیه استرین ها دو ژن افکتوری اختصاصی *Xap* را داشته که با تکثیر قطعاتی به طول ۱۰۷۱ و ۳۸۱ جفت باز برای *xopA* و *xopE3* تایید شد (شکل ۴). مناطق مورد بررسی در استرین ICMP4785 نیز ردیابی شدند.

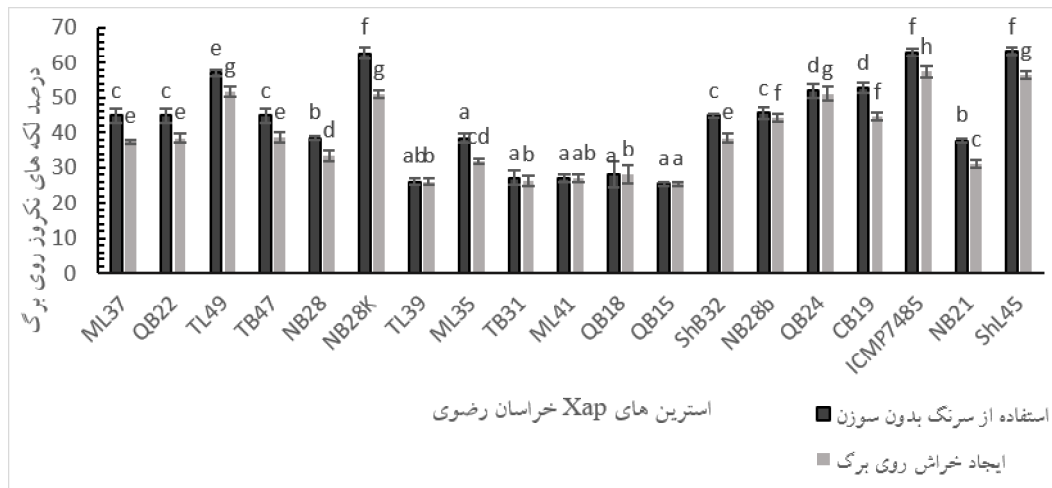
بررسی فاکتورهای دخیل در پرازایی در استرین های *Xap*

طبق جدول ۱، بیشترین میزان زانتان تولیدی در استرین های NB28، NB28k، ML41، QB15، در محدوده ۰/۲ تا ۰/۳۵ گرم برآورد شد که تفاوت معنی داری را در سطح پنج درصد با سایر جدایه ها و جدایه استاندارد نشان

در TB47 و ML37، NB28k، QB24، ShB32، TL49 گروه بیماریزایی قوی قرار گرفتند. بیشترین درصد لکه های نکروز (۶۲/۵ درصد در روش استفاده از سرنگ بدون سوزن و ۵۶/۲-۵۰ درصد در روش ایجاد خراش) در استرین های ShL45، NB28k و استرین استاندارد ICMP7485 برآورد گردید که از نظر آماری اختلاف معنی داری با سایر جدایه ها در سطح احتمال پنج درصد دارند. در گروه بیماریزایی ضعیف که دربرگیرنده استرین های TB31، QB18، QB15، TL39، ML41 و TB31 بود، درصد لکه های نکروز در حد ۲۵ درصد در هر دو روش مشخص گردید (شکل ۲).

تایید بیماریزایی بودن استرین های *Xap*

پس از بررسی بیماریزایی استرین ها در گلخانه روی نهال آلوی سانتاروزا، ردیابی پلاسמיד pXap41 و ژن های افکتوری *xopA* و *xopE3* که فقط در استرین های بیماریزا

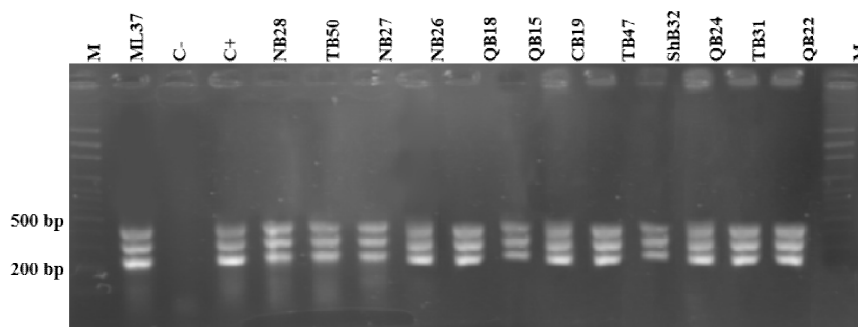


شکل ۲. بیماری‌زایی استرین‌های *Xanthomonas arboricola pv. pruni* خراسان‌رضوی در شرایط گلخانه براساس درصد لکه‌های نکروز روی برگ‌های نهال آلوی رقم سانتاروزا با استفاده از سرنگ بدون سوزن و ایجاد خراش روی برگ، Xap-ICMP7485: استرین استاندارد؛ میانگین (بعلاوه خطای استاندارد) دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد برای هر استرین می‌باشد.

Fig 2. Pathogenicity of *Xanthomonas arboricola pv. pruni* strains from Khorasan-Razavi Province in green-house conditions based on the percentage of necrosis spots on plum saplings leaves of Santa-Rosa cultivar using a needle-less syringe and scratching on the leaves, Xap-ICMP7485: reference strain; Means (+standard error) sharing a letter, were not significantly different for each strain at the 5% probability level.

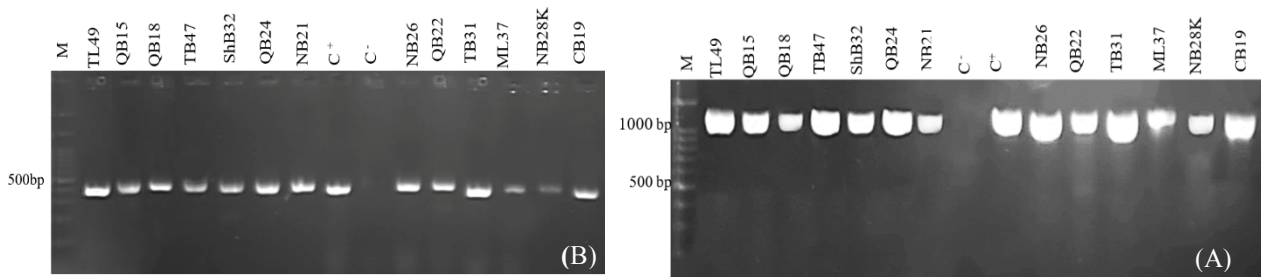
مورد مطالعه نشان داد. دو استرین TL49 و ShB32 به همراه استاندارد ICMP7485، کمترین میزان آنزیم پلی‌گالاکتوروناز را تولید نموده و در سطح معنی‌داری پنج درصد، در یک گروه آماری قرار گرفتند. در سنجش آنزیم اخیر، قطر هاله ایجاد شده در محیط مربوطه، در ۶۶/۶ درصد جدایه‌ها در دامنه ۳-۲/۲۲ سانتیمتر اندازه‌گیری شد

می‌دهد. در بررسی فعالیت آنزیم‌های لیتیک، بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز در استرین‌های ICMP7485، NB28b و NB28k دیده شد. فعالیت پروتئاز در استرین‌های ML37 و ShB32، ML35 در بالاترین میزان مشخص، و هر سه استرین در یک گروه آماری قرار گرفتند که تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌های



شکل ۳. ردیابی سه ناحیه repA1، repA2 و mobC پلاسمید pXap41 در تعدادی از استرین‌های جمع‌آوری شده *Xanthomonas arboricola pv. pruni* خراسان‌رضوی. M: سایز مارکر ۳ کیلو جفت بازی، C⁻: آب مقطر استرون، C⁺: Xap-ICMP7485

Fig 3. Detection of repA1, repA2 and mobC regions in pXap41 of some *Xanthomonas arboricola pv. pruni* strains from Khorasan-Razavi Province. M: 3kb Size Marker, C⁻: Sterile distilled water, C⁺: ICMP7485



شکل ۴. ردیابی ژن‌های افکتوری (A) *xopE3* و (B) *xopA* در تعدادی از استرین‌های جمع‌آوری شده *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

خراسان رضوی. M: سایز مارکر ۳ کیلو جفت‌بازی، C⁻: آب مقطر استرون، C⁺: Xap-ICMP7485

Fig 4. Detection of effector genes A) *XopE3* and B) *XopA* in some *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains from Khorasan-Razavi Province. M: 3kb Size Marker, C⁻: Sterile distilled water, C⁺: ICMP748

ShL45 (۲/۲۴ سانتیمتر) با تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۵).

قدرت تولید بیوفیلم نیز براساس میانگین میزان جذب‌نوری خوانده‌شده از تکرارهای مربوطه هر استرین برآورد گردید. پنج استرین NB28k، NB28b، SHL45، TL49 و QB24 بالاترین میزان تولید بیوفیلم را نشان دادند و در سطح معنی‌داری پنج درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۶).

میزان تحرک در استرین‌های Xap براساس دورشدن

که از نظر آماری با استرین استاندارد و سایر جدایه‌ها تفاوت معنی‌دار دارد ($P \leq 0.05$). کمترین میزان آنزیم پکتات‌لیاز در استرین‌های TL49، QB24، ML37، ML41 و QB22 (قطر هاله در محدوده ۰/۶۴-۰/۵۵ سانتیمتر) مشخص شد که تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌ها در سطح پنج درصد نشان می‌دهد (جدول ۱).

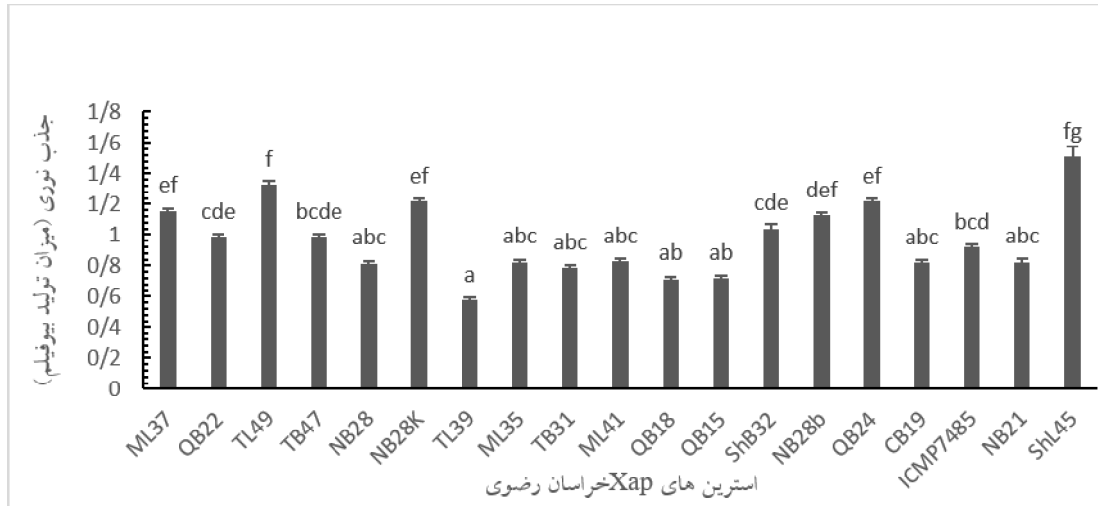
تولید بیوسورفاکتانت براساس قطر هاله تشکیلی در روغن برای تمام استرین‌ها در محدوده ۱/۵۱-۲/۲۴ سانتیمتر برآورد گردید که بالاترین میزان مربوط به استرین



شکل ۵. تولید بیوسورفاکتانت در استرین‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* خراسان رضوی با استفاده از روش انتشار در روغن.

ICMP7485: استرین استاندارد؛ ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

Fig 5. Biosurfactant production in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains from Khorasan-Razavi Province using oil spread method. ICMP7485: Reference strain; Columns with the same letters have no significant differences at the 5% probability level.

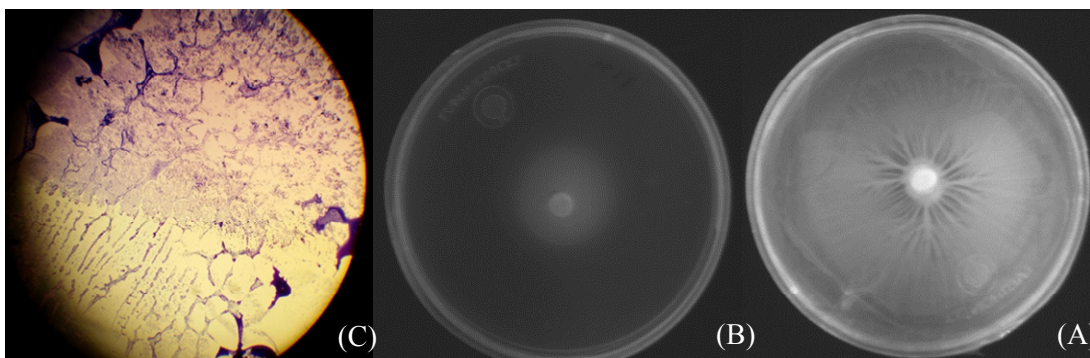


شکل ۶. تولید بیوفیلم در استرین‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* خراسان رضوی بر اساس میزان جذب نوری رنگ کریستال و یوله در طول موج ۵۷۰ نانومتر ICMP7485: استرین استاندارد؛ ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

Fig 6. Biofilm formation in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains from Khorasan-Razavi Province based on crystal violet optical adsorption at wavelength of 570 nm. ICMP7485: Reference strain columns with the same letters have no significant differences at the 5% probability level.

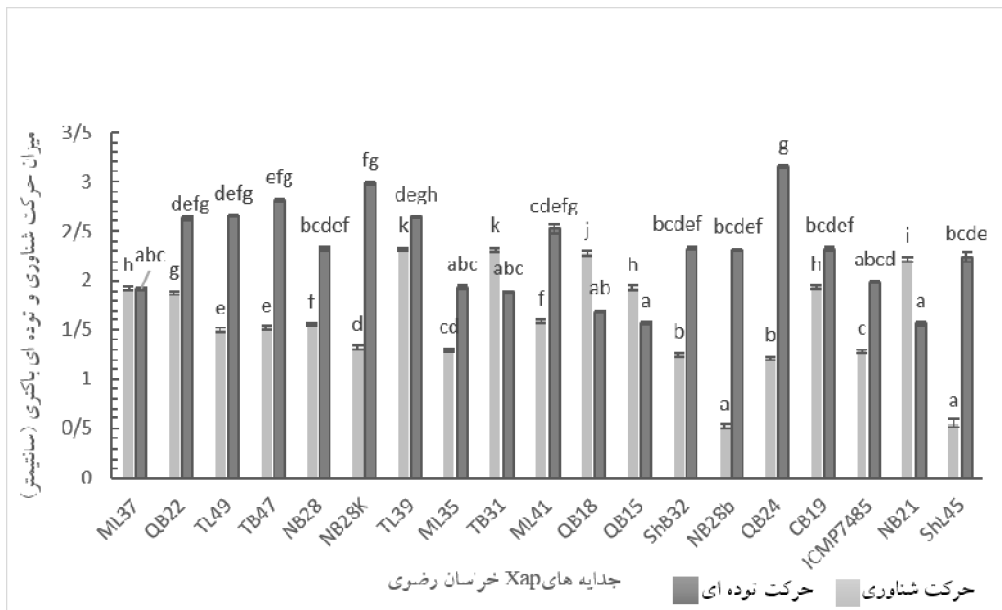
تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌ها در سطح پنج درصد نشان دادند. در حرکت توده‌ای (شکل ۸) نیز بیشترین تحرک مربوط به استرین‌های NB28k، QB24 و TB47 اندازه‌گیری شد که با سایر جدایه‌های مورد مطالعه از نظر آماری در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی‌داری ندارند. در مورد حرکت ناگهانی، مشاهدات میکروسکوپی حاکی از وجود

آنها از مرکز تشتکها اندازه‌گیری شد. الگوی حرکت پرگنه باکتری به صورت دندریتی با شعاع کم و زیاد و نیز به صورت دایره‌ای مشاهده شد (شکل ۷). میزان تحرک در دو نوع حرکت شناوری و توده‌ای در استرین‌ها، متفاوت از یکدیگر می‌باشد. در حرکت نوع شناوری (شکل ۸)، استرین‌های NB28b و SHL45 با کمترین میزان تحرک،



شکل ۷. انواع تحرک در استرین TB47 از *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: (A) حرکت توده‌ای (Swarming) (B) حرکت شناوری (Swimming) (C) حرکت ناگهانی (Twitching)

Fig 7. Types of motility in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain TB47 A) Swarming B) Swimming C) Twitching



شکل ۸. حرکت شناوری و توده‌ای در جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* خراسان‌رضوی در محیط کشت میکس‌تریال‌آگار. ICMP7485: جدایه استاندارد؛ ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

Fig 8. Swimming and Swarming motility in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains from Khorasan-Razavi Province on the MMA medium. ICMP7485: Reference strain; columns with the same letters have no significant differences at the 5% probability level.

بومی صورت نگرفته است. هیجده استرین Xap بیماریزای مورد بررسی به همراه استرین استاندارد، پلاسمید pXap41 و ژنهای افکتوری اختصاصی *xopE3* و *xopA* را دارا هستند. به نظر می‌رسد پلاسمید pXap41 در برازش اختصاصی استرین‌های Xap با میزبان دخالت دارد و در برگیرنده ژنهای *xopE3*، *xopE2* و *mltB* است، که دو ژن *xopE3* و *mltB* رمزکننده پروتئین‌های چاپرونی در ترشح پروتئین‌های افکتور تیپ III و ژن *xopE2* در مراحل کلونیزاسیون باکتری نقش دارد (Pothier et al. 2011; Hajri et al., 2012). به همین علت وجود این پلاسمید را میتوان یکی از فاکتورهای مهم در بیماریزایی باکتری Xap دانست. در ارتباط با ژن *xopA* اطلاعات مشخصی در مورد عملکرد آن وجود ندارد. در آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه، استفاده از

الگوی تحرک یکنواخت در تمام استرین‌های مورد بررسی می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر که باهدف بررسی فاکتورهای مرتبط با بیماریزایی و پرازاری استرین‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* خراسان‌رضوی انجام گرفت، نشان‌دهنده نقش برخی از فاکتورهای ذکر شده در روند آلودگی و توسعه علائم است. مطالعاتی در زمینه ظهور و بیماریزایی این باکتری در استان‌های گیلان (۱۳۸۴) و گلستان (۱۳۹۰) انجام شده است. شناسایی مولکولی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های Xap خراسان‌رضوی نیز در سال ۱۳۹۴ مطالعه شده است. اما تا به امروز مطالعه‌ای در زمینه بررسی فاکتورهای بیماریزایی و پرازاری استرین‌های Xap

درصد مشاهده شد. در حالیکه، میزان تولید زانتان در استرین‌های Xap خراسان رضوی اندک برآورد شد. بالاترین میزان (۰/۳۵ گرم) مربوط به جدایه QB15 متعلق به گروه بیماریزای ضعیف بود. براساس نتایج بررسی حاضر، به نظر می‌رسد زانتان در پرآزاری استرین‌های Xap نقش موثری ندارد.

آخرین فاکتور مورد مطالعه، آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی گیاه می‌باشد که به واسطه سیستم‌های ترشحی باکتری، به خارج سلول منتقل می‌شوند. در تعاملات میزبان-Xap، به محض ورود باکتری از طریق منافذ طبیعی یا زخم، طیفی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی تولید و منجر به تغییر در فیزیولوژی، متابولیسم و پاسخ‌های ایمنی گیاه می‌شوند و مسیر آلوده‌سازی باکتری را هموارتر می‌نمایند (Cesbron *et al.*, 2015). در بررسی حاضر، تمامی استرین‌ها قدرت ترشح آنزیم‌های ذکر شده را با مقادیر متفاوت داشتند اما میزان ترشح این آنزیم‌ها با شدت بیماریزایی استرین‌ها مطابقت کامل نداشت. بالاترین میزان تولید سلولاز در استرین‌های NB28k و NB28b به ترتیب با درصد لکه‌های نکروز ۶۲/۵ و ۴۳/۷ مشاهده شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با بقیه استرین‌ها داشت. تولید آنزیم‌های پکتولیتیک و به ویژه پکتات لیاز بیشتر در جنس‌های مولد پوسیدگی نرم موثر است (Xia *et al.* 2016)، و در بررسی حاضر نیز، مقدار آنزیم مذکور در بیشتر استرین‌های گروه بیماریزای قوی، در مقایسه با سایر آنزیم‌ها، کمتر برآورد شد. مقادیر مربوط به تولید آنزیم‌های پروتئاز و پلی‌گالاکتوروناز نیز با میزان پرآزاری استرین‌های مورد مطالعه هماهنگی نداشت. برای اطمینان از نقش آنزیم‌ها در توسعه علائم و پرآزاری نیاز به روش‌های دقیق‌تر سنجش کمی است.

باتوجه به نتایج بررسی حاضر، پلاسمید pXap41 و

روش تلقیح با سوزن بدون سرنگ پیشنهاد می‌شود چون توسعه علائم (درصد لکه‌های نکروز) روی برگ‌های آلو را مشخص‌تر نشان می‌دهد. نتیجه بدست آمده با بررسی‌های سایر محققان نیز همخوانی دارد (Socqut-Juglard *et al.* 2012; Du Plessis 1988).

در برخی موارد بین شدت علائم استرین‌ها و فاکتورهای دخیل در پرآزاری ارتباط مستقیم وجود داشت. برای مثال دو استرین NB28k و ShL45 با بالاترین درصد لکه‌های نکروز (۶۲/۵ درصد)، بیوسورفاکتانت و بیوفیلیم بیشتری تولید کردند و از نظر آماری در سطح معنی‌داری پنج درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند.

تحرك که در تعامل اولیه باکتری با سطح میزبان نقش دارد، از ارکان مهم بیماریزایی محسوب می‌شود (O'Toole *et al.* 2000). باکتری‌ها می‌توانند با سازوکارهای مختلف از جمله حرکت توده‌ای، شناوری، ناگهانی و لغزشی جابه‌جا شوند (Danhorn & Fuqua 2007). میزان حرکت توده‌ای در ۹۲/۳ درصد جدایه‌های گروه بیماریزای قوی، بالاتر از حرکت شناوری بود (شکل ۸، $P \leq 0/05$). به نظر می‌رسد استرین‌های Xap با بیماریزایی بالاتر، تمایل بیشتری به حرکت توده‌ای از خود نشان می‌دهند (Garita-Cambronero *et al.* 2016).

نقش مهم بیوسورفاکتانت و پلی‌ساکارید خارج سلولی زانتان در تعاملات سلول باکتری با سطوح مختلف و حفظ بیوفیلیم مشخص است (Danhorn & Fuqua 2007). زمان تشکیل بیوفیلیم، تعداد زیادی از سلول‌های باکتری به واسطه ماتریکس پلی‌ساکارید خارج سلولی در کنار یکدیگر قرار گرفته و امکان کلونیزه نمودن و همچنین تسهیل بیمارگری در میزبان را فراهم می‌آورند (Koczan *et al.* 2011). در بین استرین‌های مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری از نظر تولید بیوسورفاکتانت و بیوفیلیم در سطح احتمال پنج

ژن‌های *xopA* و *xopE3* در بیماریزایی باکتری *Xap* نقش دارند. به نظر می‌رسد که در بیشتر استرین‌های *Xap* بیماریزا، میزان حرکت توده‌ای، تولید بیوفیلم و بیوسورفاکتانت و ترشح آنزیم سلولاز و در برخی موارد پروتئاز می‌توانند در پرازاری باکتری موثر واقع شوند. استرین‌های ShL45 و NB28k با ۶۲/۵ درصد لکه‌های نکروز (بالاترین پرازاری)، از جنبه تولید بیوفیلم، بیوسورفاکتانت و میزان حرکت توده‌ای، اختلاف معنی‌داری با سایر استرین‌ها در سطح احتمال پنج درصد نشان دادند. در استرین NB28k، تولید آنزیم پروتئاز و به‌ویژه سلولاز از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری با سایر استرین‌های مورد بررسی داشت. برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر، ارزیابی استرین‌های *Xap* بیشتر از مناطق مختلف کشور به همراه سایر پاتووارهای گونه *X. arboricola* پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Bahar M. Mojtahedi H. and Akhyani A. 1985. Bacterial canker of apricot trees in Esfahan. Iranian. Journal of Plant Pathology 18: 58-67.
- Buttner D. and Bonas U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS Microbiology Review 34: 107-133.
- Costerton J.W. Lewandowski M.Z. Caldwell D.E. Korber D.R. and Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology 49: 711-745.
- Cesbron S. Pothier J. Gironde S. Jacques M. A. and Manceau C. 2015. Development of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas arboricola* pathovars. Journal of Microbiological Methods 100: 84-90.
- Danhorn T. and Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Microbiology 61: 401-422.
- Du Plessis H.J. 1988. Differential virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* to peach, plum, and apricot cultivars. Phytopathology 78: 1312-1315.
- Derakhshan E. Baghaee-Ravari S. and Mahdikhani-Moghaddam E. 2019. Assessment of genetic diversity among *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* strains using *gyrB* gene sequencing and rep-PCR genomic fingerprinting in north eastern Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 21: 1023-1034.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). 2014. Scientific opinion on pest categorisation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith, 1903). EFSA Journal 12: 1-25.
- Essakhi S. Cesbron S. Fischer-Le Saux M. Bonneau S. Jacques M.A. and Manceau C. 2015. Phylogenetic and VNTR analysis identified non-pathogenic lineages within *Xanthomonas arboricola* lacking the canonical type three secretion system. Applied and Environmental Microbiology 81: 5395-5410.
- Fischer-Le Saux M. Bonneau S. Essakhi S. Manceau C. and Jacques M. A. 2015. Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. Applied and Environmental Microbiology 81: 4651-4568.
- Garita-Cambronero J. Palacio-Bielsa A. and Cubero J. 2018. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, causal agent of bacterial spot of stone fruits and almond: its genomic and phenotypic characteristics in the *X. arboricola* species context. Molecular Plant Pathology 19: 2053-2065.
- Garita-Cambronero J. Palacio-Bielsa A. Lopez M.M. and Cubero J. 2016. Comparative genomic and phenotypic characterization of pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* reveals insights into the infection process of bacterial spot disease of stone fruits. PLoS One 11: e0161977.
- Garita-Cambronero J. Palacio-Bielsa A. Lopez M.M. and Cubero J. 2017. Pan-genomic analysis permits differentiation of virulent and non-virulent strains of *Xanthomonas arboricola* that cohabit *Prunus* spp. and elucidate bacterial virulence factors. Frontiers in Microbiology 8: 573.
- Guerra M.L. Malafaia C.B. Macedo A.J. Silva M.V. Mariano R.L. and Souza E.B. 2018. Biofilm formation by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* affected by abiotic surfaces and culture media. Tropical Plant Pathology 43: 146-151.

- Hajri A. Pothier J.F. Fischer-Le Saux M. Bonneau S. Poussier S. Boureau T. and Manceau C. 2012. Type three effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and Environmental Microbiology* 78:371-384.
- Jacques M.A. Arlat M. Boulanger A. Boureau T. Carrere S. Cesbron S. and Fischer-Le Saux M. 2016. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology* 54: 163-187.
- Jami F. Kazempour M.N. Elahinia S.A. and Khodakaramian, G. 2005. First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on stone fruit trees from Iranian *Journal of Phytopathology* 153: 371-372
- Kasana R.C. Salwan R. Dhar H. Dutt S. and Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology* 57:503-507.
- Koczan J.M. Lenneman B.R. McGrath M.J. and Sundin G.W. 2011. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:7031-7039.
- Moreira L.M. De Souza R.F. Digiampietri L.A. Silva A.C.R. and Da Setubal, J.C. 2005. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS* 9: 43-76
- Morikawa M. Hirata Y. and Imanaka T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488:211-218.
- O'Toole G. Kaplan H.B. and Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology* 54:49-79.
- Pothier J.F. Vorhölter F.J. Blom. J. Goesmann A. Pühler A. Smits T.H. and Duffy B. (2011). The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* 323:52-60.
- Rigano L.A. Siciliano F. Enrique R. Sendín L. Filippone P. Torres P.S. and Marano M.R. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1222-1230.
- Scharf B.E. Hynes M.F. and Alexandre G.M. 2016. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant Molecular Biology* 90: 549-559.
- Simoes M. Simões L. C. and Vieira M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43:573-583.
- Stefani E. 2010. Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology* 92: 99-104.
- Socquet-Juglard D. Patocchi A. Pothier J.F. Christen D. and Duffy B. 2012. Evaluation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* inoculation techniques to screen for bacterial spot resistance in peach and apricot. *Journal of Plant Pathology* 94:91-96.
- Vojnov A.A. Zorreguieta A. Dow J.M. Daniels M.J. and Dankert M.A. 1998. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* 144:1487-1493.
- Zaccardelli M. Malaguti S. and Bazzi, C. 1998. Biological and epidemiological aspects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Italy. *Journal of Plant Pathology* 80: 125-132.
- Zhou C. Yang Y. and Jong A.Y. 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8:172.