DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021785.442

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۲/ سال ۱۴۰۲: ۸۴-۶۹

CC BY

مقاله پژوهشی

ارزیابی مقاومت سویه‌هایی از *Pseudomonas syringae pv. syringae* از میزبان‌های گیاهی مختلف به ترکیبات مسی*

ناصر امانی فر[1]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۲ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲)

چکیده

سویه‌های (***Pss***) ***Pseudomonas syringae* pv. *syringae*** در گونه‌های مختلف گیاهان بیماریزا هستند و گاهی خسارت آن‌ها اقتصادی بوده و نیاز به کنترل شیمیایی است. در استان چهارمحال و بختیاری این بیمارگر در درختان میوه هسته‌دار، گندم، لوبیا و گیاهان گلخانه‌ای (مانند خیار) خسارت ایجاد می‌کند. در این پژوهش مقاومت تعداد ۶۲ سویه ***Pss*** از میزبان‌های مختلف به یون مس (سولفات مس) در محیط کشت بررسی شد. به ترتیب ۳۷/۱ ٪ و ۳۲/۳ ٪ سویه‌ها به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سولفات مس مقاوم بودند. پنج سویه مقاوم به مس از هلو، بادام، گیلاس، گندم و لوبیا و یک سویه حساس از خیار انتخاب شد و اثر چندین فرمولاسیون حاوی ترکیبات مسی در بازدارندگی رشد این سویه‌ها در محیط کشت ارزیابی شد. نتایج حاکی از مقاومت همه پنج سویه به ترکیبات مسی (اکسی کلرید مس، اکسید مس، کربوکسیلات مس و مخلوط بردو) با درجات مختلف بود. دو برابر کردن غلظت این ترکیبات تاثیر معنی‌داری در رشد باکتری نداشت، اما افزودن مانکوزب یا سولفات روی یا سولفات آهن به هر کدام از ترکیبات مسی اثر بازدارندگی معنی‌داری در رشد باکتری روی محیط کشت داشت و بیشترین بازدارندگی رشد سویه‌ها مربوط به فرمولاسیون کربوکسیلات مس بعلاوه مانکوزب بود. ژن ***CopA*** مسئول مقاومت به مس در پنج سویه مقاوم و تعداد دیگری از سویه‌های ***Pss*** ردیابی شد و نتایج آزمایش‌های داخل پتری را تایید کرد. بر این اساس می‌توان گفت مقاومت به ترکیبات مسی در سویه‌های مختلف ***Pss*** وجود دارد و برای کنترل شیمیایی بایستی به ترکیبات مسی ترکیبات با اثر هم‌افزایی برای باکتری‌کشی افزود. بر اساس نتایج این پژوهش موثرترین فرمولاسیون برای کاهش جمعیت سویه‌های ***Pss*** مقاوم به مس و کنترل بیماری‌های ناشی از آنها ترکیب کربوکسیلات مس یا اکسید مس بعلاوه مانکوزب و اوره است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌ها، فرمولاسیون، کنترل شیمیایی، مس، مقاومت

---

* بخشی از نتایج پروژه‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sahragardn@yahoo.com

۱ دانشیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021785.442

Research Article
Assessment Resistance Strains of Pseudomonas syringae pv. syringae from Different Plant Hosts to Copper Compounds*

Naser Amanifar[1**]

(Received: 21.02.2024; Accepted: 11.05.2024)

Abstract

Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) are pathogenic in various types of plants, sometimes causing economic damage that requires chemical control. In Chaharmahal va Bakhtiary province, this pathogen damages stone fruit trees, wheat, beans, and greenhouse plants like cucumber. This study investigated the resistance of 62 *Pss* strains from different hosts to copper ions (copper sulfate) in a culture medium. Results showed that 37.1% and 32.3% of the strains were resistant to 100 and 200 µg/ml copper sulfate concentrations, respectively. Five copper-resistant strains from peach, almond, cherry, wheat, and beans and one sensitive strain from cucumber, were selected for further evaluation. The effect of various formulations containing copper compounds on inhibiting the growth of these strains in the culture medium was assessed. All five isolates showed varying resistance to copper compounds (copper oxychloride, copper oxide, copper carboxylate, and Bordeaux mixture). Doubling the concentration of these compounds did not significantly affect bacterial growth. However, adding mancozeb, zinc sulfate, or iron sulfate to each copper compound significantly inhibited bacterial growth on the culture medium. The copper carboxylate formulation combined with mancozeb was the most effective inhibition. The *CopA* gene, responsible for copper resistance, was detected in the five resistant strains and other *Pss* strains, confirming the results of the experiments. In conclusion, there is resistance to copper compounds in various *Pss* strains. For effective chemical control, compounds with a synergistic effect on bactericidal activity should be added to copper compounds. The most influential formulation identified in this study for reducing the population of copper-resistant *Pss* strains and controlling diseases caused by them is a combination of copper carboxylate or copper oxide with mancozeb and urea.

Key words: bacteria, formulation, chemical control, copper, resistance

* A part of research projects submitted to Charmahal va Bakhtiary Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran

**Corresponding author's E-mail address: sahragardn@yahoo.com

1 Associate Professor of Department of Plant Protection Research, Charmahal va Bakhtiary Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran

مقدمه

سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) انتشار جهانی داشته و دامنه میزبانی آن‌ها وسیع است به‌طوریکه بیش از ۱۸۰ گونه از گیاهان یکساله، چند ساله، درختان میوه، گیاهان زینتی و سبزیجات را آلوده می‌کنند (Agrios, 2005; Lamichhane *et al*., 2015, Amanifar, 2020a). اهمیت این باکتری در مناطق خنک و سردسیر بیشتر است و در برخی از میزبان‌ها باعث خسارت اقتصادی می‌شود به گونه‌ای که نیاز به کنترل شیمیایی با ترکیبات مسی است که در مواردی رضایت بخش نیست (Amanifar, 2019, 2020a, Lee *et al*., 2023). از طرفی کنترل شیمیایی بیماری‌های باکتریایی به طور سنتی شامل استفاده از ترکیبات مبتنی بر مس است و به‌رغم سمیت بالا برای باکتری‌های بیمارگر گیاهی برای پستانداران نیز سمیت کمی دارند. بیش از ۱۰۰ سال است که از این ترکیبات برای این منظور استفاده شده است اما با ظهور سویه‌های مقاوم برخی باکتری‌ها از جمله *Pss*، استفاده از آنها محدود شده است (Husseini & Akköprü, 2020).

برای بهبود کارایی باکتری‌کش‌های مبتنی بر مس، افزودن ترکیباتی همانند دی‌تیوکاربامات‌ها به ترکیبات مسی معمولاً مرگ و میر بیمارگرهای باکتریایی را افزایش می‌دهند، چنین دستاوردی اولین بار با افزودن مانکوزب و مانب به ترکیبات مسی برای مدیریت بیماری‌های باکتریایی سبزیجات به‌دست آمد (Conover & Gerhold, 1981). امروزه یکی از روش‌های مدیریت مقاومت به ترکیبات مسی در باکتری‌ها استفاده از نانوذرات هیبرید روی- مس است. این نانوذرات اثر ضد باکتریایی روی سویه‌های مقاوم به مس در مقایسه با ترکیبات تجاری مس دارد همچنین سمیت و گیاه‌سوزی برای گیاه ندارد. علاوه بر روی از عناصری همانند تیتانیم و منیزیم تاکنون برای تهیه نانو ذرات هیبریدی همراه با مس جهت مدیریت سویه‌های مقاوم به ترکیبات مسی در جنس سودوموناس و زانتوموناس استفاده‌شده است (Carvalho *et al*. 2019). انواع مختلفی از دستورالعمل‌های آزمایشگاهی و محیط‌های کشت برای سنجش مقاومت گونه‌های باکتری بیمارگر گیاهی به ترکیبات مسی بررسی شده است (Pernezny *et al*. 2008)، استفاده از سولفات مس با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت آگار مغذی به‌علاوه گلوکز مناسب تشخیص داده شده است (Zhang *et al*. 2017).

یون‌های مس برای واکنش‌های اکسیداسیون باکتری‌ها ضروری هستند، اما اگر سطح یون‌های آزاد کنترل نشود، می‌توانند اثر سمی زیادی برای سلول ایجاد کنند. سازوکارهای متعددی در مقاومت به مس در باکتری‌ها وجود دارد و اکثراً منشأ پلاسمیدی دارند که از جذب سلولی سطوح بالای یون‌های آزاد مس جلوگیری می‌کنند. با این حال، برخی باکتری‌ها ظاهراً سیستم‌های کدگذاری کروموزومی کارآمدی برای جذب و مدیریت سطوح ردیابی مس دارند (Bondarczuk & Piotrowska-Seget, 2013). بررسی‌ها نشان داده احتمالاً مقاومت به مس مستقیماً از طریق تغییرات ژن‌های جذب مس کروموزومی تکامل‌یافته است (Fan *et al*., 2022). تجزیه و تحلیل‌های مولکولی شباهت‌های شگفت‌انگیزی را بین ژن‌های مقاومت مس از جنس‌های مختلف باکتریایی که دارای سازوکارهای مقاومت متفاوتی هستند، نشان می‌دهد. سیستم‌های مقاومت متعددی در میکروب‌ها برای حفظ هموستازی مس با سایر عناصر ضروری در شرایط تنش یا غلظت بالای مس تکامل یافته‌اند. این سیستم‌ها مسئول ورود و خروج یون‌های مس در سلول‌ها هستند (Fan *et al*., 2022). مواد شیمیایی مبتنی بر مس به‌طور گسترده‌ای برای کنترل بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها استفاده می‌شود که منجر به مقاومت القایی ناشی از سیستم‌های مختلف مقاومت مس در بیمارگر می‌شود

(Arnesano *et al*. 2002; Fan *et al*., 2022).

گزارش‌های متعددی از مقاومت سویه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف با سطح بالایی از مقاومت به مس در شرایط محیط کشت وجود دارد (Spotts & Cervantes, 1995, Fan *et al*., 2022). افزایش غلظت ترکیبات مسی در شرایط مزرعه و آزمایشگاه تاثیر معنی‌داری در کاهش جمعیت سویه‌های مقاوم به مس نداشته است (Andersen *et al*., 1991, Ritchie & Bennett, 1991).

در *P. s.* pv *tomato*، چهار ژن واکنش به مس، یعنی *CopABCD* که در یک پلاسمید ۳۵ کیلوبایتی به نام *pPT23D* جای دارند، وجود دارد. این پلاسمید توسط یک پروموتر که به‌طور خاص توسط یون‌های مس القا می‌شود، کنترل می‌شود. این ژن‌ها به ژن‌های *pco* در *Escherichia coli* شباهت‌هایی دارند (Cazorla *et al*. 2002; Fan *et al*. 2022).

در همه پژوهش‌های انجام شده افزودن یکی از ترکیبات دی‌تیوکاربامات (مانند مانب و مانکوزب) به سموم مسی اثر معنی‌داری در بازدارندگی رشد گونه‌های مختلف باکتری‌ها در محیط کشت یا کنترل بیماری‌های ناشی از آنها در مقایسه به استفاده تنها از ترکیبات مسی وجود داشته است (Parsons and Edgington, 1991, Scheck & Pscheidt, 1998, Husseini & Akköprü, 2020,). ترکیباتی همانند دی‌تیوکاربامات‌ها و روی میزان سمیت ترکیبات مسی را با حمل یون‌های مس (Cu^{2+}) به سایت‌های حساس سلول باکتری افزایش می‌دهند (Medhekar & Boparai, 1981)، همچنین دی‌تیوکاربامات‌ها با نمک‌های مس یک کلات (chelate) تشکیل می‌دهند و از کمپلکس شدن ترکیبات مسی با مواد آلی گیاهی جلوگیری کرده و آزاد شدن و اثر گذاری آن‌ها را تدریجی و طولانی می‌کند (Husseini & Akköprü, 2020).

بر اساس منابع در دسترس هیچ‌گونه پژوهشی در خصوص مقاومت باکتری‌های بیمارگر گیاهی به ترکیبات مسی در ایران انجام نشده است و روش معمول کنترل شیمیایی بیماری‌های باکتریایی استفاده از ترکیباتی همانند مخلوط بردو، اکسی کلرید مس یا ترکیبات مشابه است. با توجه به نتایج آزمایش‌های مزرعه‌ای در ارزیابی اثر فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی برای کنترل شیمیایی شانکر باکتریایی هلو ناشی از *Pss* (Amanifar, 2019b) و اهمیت این باکتری در انواع گیاهان زراعی و باغی در استان چهارمحال و بختیاری، به منظور دستیابی به فرمولاسیون مناسب جهت کنترل شیمیایی بیماری‌های ناشی از *Pss*، اثر بازدارندگی فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی روی رشد چند سویه از این باکتری در محیط کشت ارزیابی شد، همچنین ردیابی چندین ژن مسئول مقاومت به مس برای تایید نتایج آزمایش‌های داخل محیط کشت در تعدادی از سویه‌های منتخب انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت سویه‌های *Pss*: از کلکسیون سویه‌های *Pss* موجود در آزمایشگاه بخش تحقیقات گیاهپزشکی شهرکرد ، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، که طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۴۰۰ از میزبان‌های مختلف در استان چهارمحال و بختیاری جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شده بودند استفاده شد. سویه‌ها در محیط کشت مایع مغذی (nutrient broth) به‌علاوه گلیسیرین در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بودند که برای زنده‌مانی آن‌ها هر شش ماه بازکشت می‌شدند. برای بازکشت سویه‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر محیط مایع حاوی یاخته‌های باکتری روی محیط کشت‌های آگار مغذی و King's B پخش شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از کشت ۴۸ ساعته سویه‌ها

برای آزمایش‌های مورد نظر استفاده شد.

ارزیابی اثر فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی روی سویه‌های *Pss* در شرایط محیط کشت

الف- گروهبندی سویه‌های *Pss* از نظر مقاومت به مس با استفاده از سولفات مس: تعداد ۶۲ سویه از *Pss* از میزبان‌های مختلف شامل بادام (۱۲ سویه)، هلو (۱۸ سویه)، گیلاس (۷ سویه)، گندم (۱۱ سویه)، لوبیا (۹ سویه) و خیار (۵ سویه) انتخاب شد و در شرایط محیط کشت (in vitro) مقاومت آنها به مس (سولفات مس) بررسی گردید. از محیط کشت آگار مغذی به‌علاوه پنج درصد گلوکز (nutrient agar glucose, NAG) استفاده شد و رشد باکتری در محیط کشت حاوی مس یا بدون مس مقایسه شد. ابتدا سولفات مس آزمایشگاهی ($CuSO_4.5H_2O$, G 98%, Merck) در آب مقطر سترون ولرم حل و از فیلتر ۰/۲ میکرونی عبور داده شد، پس از اتوکلاو کردن محیط کشت با سرد شدن محیط کشت در دمای حدود ۵۰ درجه سلسیوس، سوسپانسیون مس به آن اضافه شد. از دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (µg/ml) سولفات مس استفاده گردید (Scheck & Pscheidt, 1998, Zhang *et al*. 2017). از کشت ۴۸ ساعته از هر کدام از ۶۲ سویه روی NAG، سوسپانسیونی به غلظت 10^6 سلول باکتری در میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه شد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن روی محیط کشت پخش شد. برای هر سویه سه تشتک پتری (۱۲ سانتی‌متری) در نظر گرفته شد. از محیط کشت NAG بدون افزودن سولفات مس به‌عنوان شاهد برای هر سویه استفاده شد. ظروف پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. با تخمین چشمی نرخ رشد سویه‌ها در محیط‌های کشت حاوی مس با مقاسه با میزان رشد آن‌ها در محیط بدون سولفات مس به شکل درصد رشد بدست آمد (Pernezny *et al.*, 2008). بر این اساس و به شرح زیر سویه ها با توجه به نرخ رشد (میانگین درصد رشد) در شش گروه (نرخ رشد) صفر تا ۵ تفکیک شدند.

۰= ۰٪، ۱= ۱-۱۰٪ ، ۲= ۱۱-۲۵٪ ، ۳= ۲۶-۵۰٪ ، ۴= ۵۱-۷۵٪ و ۵= ۷۶-۱۰۰٪

برای اطمینان همه سویه‌ها به طور مشابه برای بار دوم از نظر وجود ژن‌های مقاومت به مس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز غربالگری شدند.

طرح آزمایشی به صورت کاملا تصادفی با سه تکرار بود. نتایج با نرم افزار SAS تجزیه آماری و مقایسه میانگین شدند. سویه‌هایی با نرخ رشد صفر که در گروه ۰ (صفر) قرار گرفتند حساس (sensitive) به مس (عدم رشد باکتری)، آنهایی که در گروه‌های (نرخ‌های رشد) ۱، ۲، ۳ و ۴ بودند نسبتا مقاوم (مقاومت متوسط) (moderately resistance) و جدایه‌هایی که در گروه ۵ قرار گرفتند دارای مقاومت بالا (highly resistance) تلقی شدند (Zhang *et al*., 2017).

ب- ارزیابی چند فرمولاسیون ترکیبات مسی در رشد سویه‌های مقاوم *Pss* به مس در محیط کشت: از آزمایش مقاومت سویه‌ها به سولفات مس (بند الف) پنج سویه *Pss* با مقاومت بالا (از هلو، بادام، گیلاس، گندم و لوبیا) و یک سویه حساس به مس (از خیار) انتخاب شد و اثر بازدارندگی چند فرمولاسیون ترکیبات مسی به روش شرح داده شده در بند الف ارزیابی شد. از اکسی کلرید مس (WP, 35%)، اکسیدمس (نوردوکس® WG, 83.9%)، کربوکسیلات‌مس (کوکسیل® WP, 91%) و مخلوط بردو (بردوفیکس® Bordeaufix S, 18%)، اوره (G, 46%)، مانکوزب (WP, 80%) سولفات روی (WP, 33%)، سولفات آهن (WP, 20%) و برخی تیمارها شامل غلظت دو برابر ترکیب مسی، مخلوطی از ترکیبات مسی فوق با اوره یا سولفات روی، سولفات آهن و یا مانکوزب استفاده شد (Scheck & Pscheidt, 1998) (جدول ۱). معیار استفاده از غلظت‌های مورد استفاده (جدول ۱) دستورالعمل تجاری توصیه شده برای کاربرد این ترکیب‌ها در سمپاشی

علیه بیماری‌های باکتریایی در مزرعه و باغ بوده است، برای هر تیمار و هر جدایه سه ظرف پتری در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح‌های کاملا تصادفی بود.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در آزمایش ارزیابی مقاومت سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در محیط کشت به ترکیبات مسی و فرمولاسیون‌های مختلف آن‌ها

Table 1- The treatments used for assessing resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains to copper compounds and formulations in culture medium

Treatment	Common name	Trade name	Concentration
1	Copper oxycholoride (CO)	Cupravit 35% WP	2.5 g/l
2	Bordeaux mixtures (BM)	Bordofix 18% SC	10 g/l
3	Nordox (N)	Copper oxide 83.9% WG	1 g/l
4	Copper carboxyl (CC)	Coxyl91 91% WP	0.7 g/l
5	Mancozeb (Mn)	Dithan M 45 80% WP	2 g/l
6	Urea	Urea 46% G	3 g/l
7	Zinc (Zn)	Zinc sulphate 33% PW	2 g/l
8	Fe	Ferric sulphate 20% PW	2 g/l
9	CO×2		5 g/l
10	BM×2		20 g/l
11	N×2		2 g/l
12	CC×2		1.4 g/l
13	CO+Urea	-	2.5 g/l-3 g/l
14	CO+Zn	-	2.5 g/l-2 g/l
15	CO+Fe	-	2.5 g/l-2 g/l
16	CO+Mn		2.5 g/l-2 g/l
17	BM+Urea	-	10 g/l-3 g/l
18	BM+Zn	-	10 g/l-2 g/l
19	BM+Fe	-	10 g/l-2 g/l
20	BM+Mn	-	10 g/l-2 g/l
21	N+Urea	-	1 g/l-3 g/l
22	N+Zn	-	1 g/l-2 g/l
23	N+Fe	-	1 g/l-2 g/l
24	N+Mn	-	1 g/l-2 g/l
25	CC+Urea	-	0.7 g/l-3 g/l
26	CC+Zn	-	0.7 g/l-2 g/l
27	CC+Fe	-	0.7 g/l-2 g/l
28	CC+Mn	-	0.7 g/l-2 g/l
29	Control (water)	-	-

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: طرح آزمایشی مورداستفاده طرح کامل تصادفی بود و برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده شد، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (در سطح احتمال ۵٪) استفاده شد (Statistical Analysis System;SAS Institute, Cary, NC, 2004).

ردیابی ژن‌های مقاومت به ترکیبات مسی در سویه های *Pss*: برای تایید نتایج آزمایش‌های ارزیابی مقاومت سویه‌های*Pss* به ترکیبات مسی در محیط کشت، ۱۲ سویه بسیار مقاوم (درجه ۵ از مقاومت) به سولفات مس (در غلظت ۲۰۰ µg/ml) و پنج سویه حساس انتخاب شد و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای *CopA*1/*CopA*2 ،

*CopB*1/*CopB*2 ، *CopD*1/ *CopD*2،*CopC*1/*CopC*2، *CopS*1/*CopS*2 و *CopR*1/*CopR*2 (جدول ۲) ترادف مربوط به ژن‌های*CopA* ، *CopB*، *CopC* ، *CopD*، *CopS* و *CopR* (مسئول مقاومت به مس) در آن‌ها ردیابی شد (Zhang *et al*., 2017, Husseini and Akköprü 2020). واکنش های PCR با استفاده از TaKaRa *Taq*TM (HotStartVersion,TakaraBioInc.) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix (2 × Premix)، ۰/۱ میکرومولار از هر آغازگر و ۸ میکرولیتر آب مقطر بود. ۳۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده از باکتری و یا بخش کوچکی از پرگنه باکتری در آب مقطر برای PCR استفاده شد. برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ تا ۵۹ درجه سلسیوس (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور گسترش نهایی نگهداری شد. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ پنج ولت بر سانتی‌متر به مدت یک ساعت انجام شد، سپس با اتیدیوم بروماید (۱۰ میکروگرم در لیتر) رنگ‌آمیزی و در نور UV مشاهده گردید.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های مقاوم به مس در سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Table 2: Primers used to detect copper-resistant genes in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains

Primer	Sequence (5'-3')	Reference	Amplicon size (bp)
CopA1	ACTCACCCAATCCATCTGCA	Cha & Cooksey 1991	196
CopA2	GAACTTCGCGGAACATACCC		
CopB1	GCCTGTCTGAAACCGAAGTC	Cha & Cooksey 1991	166
CopB2	ATACGCACACCCAGGACTAG		
CopC1	CCAAGCTGGTTTCTTCGACT	Cha & Cooksey 1991	163
CopC2	GCTGTTTTGACTCCCATCGG		
CopD1	TGCGGACATCCTTCATCTGT	Cazorla et al. 2002	167
CopD2	CTATTAGCGCCACGATCACC		
CopR1	GGTACTGTTTCTGACCGCAC	Cazorla et al. 2002	181
CopR2	AAGGTCTCCGATTTGCAAGC		
CopS1	TTGCAGAACCTCCCCAATCA	Cazorla et al. 2002	220
CopS2	AATAGAACGCCCCAGAACCA		

نتایج

الف- ارزیابی مقاومت سویه‌های *Pss* به مس (سولفات مس): واکنش سویه‌ها به CU^{2+} با بنیان سولفات مس متفاوت بود. بین دو غلظت سولفات مس از نظر واکنش حساسیت یا مقاومت سویه‌ها اگرچه تفاوت وجود داشت اما معنی‌دار نبود. به ترتیب۶۲/۹ ٪ و ۶۷/۷ ٪ سویه‌ها در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سولفات مس رشد نکردند یا به عبارتی به یون مس حساس بودند، بنابراین به ترتیب ۳۷/۱ ٪ و ۳۲/۳ ٪ سویه‌ها به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سولفات مس مقاوم بودند (جدول ۳). وجود سویه‌های *Pss* مقاوم به یون مس در همه میزبان‌ها مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۳- واکنش سویه‌های ***Pseudomonas syringae* pv. *syringae*** به دو غلظت سولفات مس در محیط کشت

Table 3: Reaction of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains to two concentrations of copper sulfate in culture medium

Response	No. of strain sensitive or resistant to copper	
	100µg/ml$CuSO_4.5H_2O$	200 µg/ml$CuSO_4.5H_2O$
Sensitive	39a	42a
Moderately resistant (MR)	13bc	8c
High resistant (HR)	10bc	12bc
Resistant (MR+HR)	23b	20b

حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری از نظر واکنش سویه‌های *Pss* به مس ندارند (دانکن P≥5%).

Common letters are not significantly different at the 5% probability (Duncan's P≥5%) level

جدول ۴- واکنش سویه‌های ***Pseudomonas syringae* pv. *syringae*** از میزبان‌های مختلف به دو غلظت سولفات مس در محیط کشت

Table 4: Reaction of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from different plant hosts to two concentrations of copper sulfate in culture medium

Concentration $CuSO_4.5H_2O$	No. isolate of each host	No. of strain sensitive or resistant to copper			
		Sensitive	Moderately resistant (MR)	High resistant (HR)	Resistant (MR+HR)
100 µg/ml	peach (18)	10	4	4	8
	almond (12)	7	3	2	5
	sweet cherry (7)	4	2	1	3
	wheat (11)	8	2	1	3
	bean (9)	7	1	1	2
	cucumber (5)	3	1	1	2
Sum		39	13	10	23
200 µg/ml	peach (18)	12	2	4	6
	almond (12)	7	2	3	5
	sweet cherry (7)	4	1	2	3
	wheat (11)	8	2	1	3
	bean (9)	7	1	1	2
	cucumber (5)	4	0	1	1
sum		42	8	12	20

ب- واکنش رشد سویه‌های مقاوم *Pss* به مس در محیط کشت حاوی فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی: تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تیمارهای آزمایشی، سویه‌ها و اثر متقابل آن‌ها با هم تفاوت آماری دارند (جدول ۵). تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مقاوم به مس در مقایسه با سویه حساس (از خیار) از نظر میانگین‌های رشد در واکنش به فرمولاسیون‌های مختلف به ترکیبات مسی وجود دارد و فرمولاسیون‌ها در گروه‌های مختلف آماری قرار می‌گیرند (جدول ۶). اگرچه تفاوت معنی‌داری بین همه فرمولاسیون‌ها (بجز اوره) از نظر بازدارندگی رشد سویه‌های مقاوم *Pss* به مس در مقایسه با شاهد وجود داشت، اما افزودن ترکیباتی همانند روی، آهن و مانکوزب به هر کدام از ترکیبات مسی مورد آزمایش در این پژوهش اثر معنی‌داری در بازدارندگی رشد سویه‌های مقاوم به مس داشت. بیشترین تاثیر مربوط به افزودن مانکوزب به هر کدام از ترکیبات مسی بود. اثر افزودن این ترکیبات در بازدارندگی رشد سویه‌های مقاوم از دو برابر کردن غلظت ترکیب مسی بیشتر بود. بهترین تیمار آزمایشی برای بازدارندگی رشد سویه‌های مقاوم به مس به ترتیب اثر گذاری شامل: تیمارهای مانکوزب + کربوکسیلات مس (شکل ۱)، مانکوزب + نوردوکس، مانکوزب + اکسی

کلرید مس و مانکوزب + مخلوط بردو بود. افزودن اوره به محیط کشت در هیچ‌کدام از ترکیبات مسی اثری معنی‌دار در رشد باکتری نداشت اما افزودن روی و آهن اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس ارزیابی مقاومت تعدادی از سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به ترکیبات مسی در محیط کشت (Pr >F)

Table 5: Variance analysis of resistance assessment in a number of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains to copper compounds in culture medium (Pr>F)

Source	DF	MS
treatment	28	50.9**
isolate	5	0.013**
Treatment*isolate	140	0.46**
Error	696	0.32
CV	-	6.3

** significant at level 1% ** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های میزان رشد تعدادی از سویه‌های مقاوم به مس *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به ترکیبات مسی در محیط کشت (P=0.05).

Table 6: Comparison of mean squares growth rate in a number of copper-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains to copper compounds in culture medium (p=0.05)

Treatment	Mean
Control	5a
Urea	4.88a
Fe	4.54b
Bordeaux mixture	4.33bc
Zinc	4.32bc
Bordeaux mixture × 2	4.16c
Bordeaux mixture + Urea	4.04c
Copper oxycholoride + Urea	4.04c
Copper oxycholoride	3.95c
Copper oxycholoride×2	3.95c
Bordeaux mixture + Zinc	3.52d
Mancozeb	3.25e
Copper oxide	3.11e
Copper oxide + Urea	3.02e
Copper Oxycholoride + Fe	2.95f
Copper Oxycholoride + Zinc	2.84f
Copper oxide ×2	2.72g
Copper Carboxyl + Urea	2.36h
Bordeaux mixture + Fe	2.32h
Copper oxide + Zinc	2.13hi
Copper Carboxyl	1.97i
Copper oxide + Fe	1.96i
Copper Carboxyl ×2	1.59j
Copper Carboxyl +Fe	1.59j
Copper Carboxyl + Zinc	1.43k
Bordeaux mixtures + Mancozeb	0.96l
Copper Oxycholoride + Mancozeb	0.91l
Copper oxide + Mancozeb	0.88l
Copper Carboxyl + Mancozeb	0.36m

Common letters are not significantly different at the 5% probability (Duncan's P≥5%) level حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند. (دانکن P≥5%).

اگرچه همه پنج سویه منتخب به مس مقاوم بودند اما واکنش متفاوتی به فرمولاسیون‌های مسی نشان دادند و هر پنج سویه مقاوم به مس با سویه حساس (سویه خیار) تفاوت معنی‌دار نشان دادند (جدول ۷).

جدول ۷- میانگین‌های میزان رشد سویه‌های مقاوم به مس در مقایسه با سویه حساس *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در محیط کشت حاوی فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی

Table 7: Mean growth rate of copper-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains compared to a sensitive strain in culture medium containing different formulations of copper compounds

Isolate	Host	Mean
PEACH-16	Peach	2.89a
SWEET-7	Sweet cherry	2.86ab
WHEAT-GOHARBARAN	Wheat	2.86ab
ALMOND-9	Almond	2.83b
BEAN-DEZAC5	Bean	2.82b
CUCUMBER-PSS3	Cucumber	0.52c

حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند (دانکن P≥5%).

Common letters are not significantly different at the 5% probability (Duncan's P≥5%) level

ردیابی ژن‌های مسئول مقاومت به ترکیبات مسی در سویه های *Pss* : قطعه ۱۹۶ جفت بازی مربوط به ژن *CopA* در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در همه ۱۲ سویه که به سولفات مس در شرایط محیط کشت مقاومت نشان دادند، تکثیر شد، سایر قطعات مورد انتظار مربوط به ژن‌های *CopB*، *CopC*، *CopD*، *CopS* و *CopR* تکثیر نشدند، در پنج سویه حساس به یون مس هیچ‌کدام از قطعات تکثیر نشدند (شکل ۲).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که به ترتیب ۲۳ (۳۷/۱ ٪) و ۲۰ (۳۲/۳ ٪) سویه از ۶۲ سویه *Pss* به یون مس با بنیان سولفات مس در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقاوم هستند. بیشترین فراوانی مقاومت به ترتیب در سویه‌های هلو، گیلاس، بادام، خیار، گندم و لوبیا بود (جدول ۳). شاید دلیل فراوانی مقاومت در درختان میوه به‌خاطر تعدد سمپاشی علیه بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران است که به موجب آن جمعیت سویه‌های حساس به ترکیبات مسی در اثر سمپاشی حذف و شرایط برای اشغال آشیان اکولوژیکی توسط سویه‌های مقاوم مهیا می‌شود (Cazorla *et al*. 2002, Husseini & Akköprü 2020)، این وضعیت در گلخانه‌ها نیز وجود دارد و در طول یک دور کشت خیار چندین بار سمپاشی علیه سوختگی باکتریایی برگ خیار انجام می‌شود (Amanifar, 2019). اگرچه با دو برابر کردن غلظت سولفات مس (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعداد بیشتری سویه (سه سویه بیشتر) واکنش حساسیت (عدم رشد در محیط کشت) نشان دادند، اما تفاوت معنی‌داری بین دو غلظت از نظر واکنش مقاومت و یا حساسیت سویه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف نبود (جداول ۳ و ۴)، به عبارتی با افزایش غلظت ترکیب مسی نمی‌توان چالش مقاومت به مس را رفع کرد. چنین نتایجی توسط سایر محققین نیز به‌دست آمده است (Zhang *et al*. 2017).

هنوز استانداردی برای طبقه‌بندی باکتری‌ها از نظر حساسیت و مقاومت به مس وجود ندارد (Malik & Jaiswal, 2000). با این حال، بر اساس واکنش رشد سویه‌های *Pss* به سولفات مس (در غلظت‌های ۳/۲-۰/۸ میلی مولار) سویه‌های این باکتری را می‌توان به حساس،

مقاومت کم، مقاوم و بسیار مقاوم گروه‌بندی کرد (Aiello *et al*., 2015). پاتووارهای *P. syringae* تحمل متفاوتی به سطوح و فرمولاسیون‌های مختلف مس دارند و گاهی نتایج متفاوت و متناقض به‌دست آمده است. این تفاوت‌ها را می‌توان به ویژگی‌های بیمارگر، میزان حلالیت ماده فعال و نوع مواد به‌کار رفته در فرمولاسیون (Husseini & Akköprü, 2020) و احتمالا شرایط آزمایش نسبت داد. به عنوان مثال در نتایج ارزیابی فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی برای کنترل شانکر باکتریایی هلو در باغ (Amanifar, 2020b) افزودن اوره به ترکیبات مسی اثر معنی‌داری در کاهش بیماری در باغ داشته اما در این پژوهش اضافه کردن اوره به محیط کشت حاوی ترکیبات مسی در میزان بازدارندگی رشد *Pss* اثر نداشت. همچنین بین تیمار شاهد و تیمار محیط آگار مغذی بعلاوه اوره (بدون سایر ترکیبات) نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۶).

در پژوهش‌های انجام شده افزودن یکی از ترکیبات دی‌تیوکاربامات (مانند مانب و مانکوزب) به سموم مسی اثر معنی‌داری در بازدارندگی رشد گونه‌های مختلف باکتری‌ها در محیط کشت و یا کنترل بیماری‌های ناشی از آنها در مقایسه به استفاده تنها از ترکیبات مسی وجود داشته است (Scheck & Pscheidt, 1998, Husseini & Akköprü, 2020, Amanifar, 2020b)، در این پژوهش نیز چنین نتایجی به‌دست آمد. ترکیباتی همانند دی‌تیوکاربامات‌ها و روی میزان سمیت ترکیبات مسی را با حمل یون‌های مس (Cu^{2+}) به سایت‌های حساس سلول باکتری افزایش می‌دهند (Medhekar & Boparai, 1981). همچنین دی‌تیوکاربامات‌ها با نمک‌های مس یک کلات (chelate) تشکیل می‌دهند و از کمپلکس شدن ترکیبات مسی با مواد آلی گیاهی جلوگیری کرده و آزاد شدن و اثر گذاری آن‌ها را تدریجی و طولانی می‌کند (Husseini & Akköprü, 2020).

زمانی که یک سویه باکتری ژن مقاومت به مس را دریافت می‌کند با کاربرد مستمر مس و با کاهش جمعیت سویه‌های حساس در آشیان‌های اکولوژیکی به‌تدریج فراوانی جمعیت سویه مقاوم به مس افزایش یابد (Sundin *et al*., 1989, Husseini & Akköprü, 2020). در این مطالعه مقاومت به مس در سویه‌های میزبان‌هایی همانند هلو، به دلیل تعدد کاربرد سموم مسی برای کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی، فراوانتر بود. از شش ژن مسئول مقاومت در باکتری‌های جنس سودوموناس، در این پژوهش (*CopA* ، *CopB*، *CopC* ، *CopD*، *CopS* و *CopR*) فقط قطعه مربوط به ژن *CopA* در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در سویه‌های مقاوم به مس (بر اساس نتایج آزمایش‌های داخل محیط کشت) تکثیر شد و در سویه‌های حساس ردیابی نشد. چنین نتایجی توسط سایر محققین به‌دست آمده است (Nakajima *et al*., 2002, Akköprü, 2020). ژن *CopA* حیاتی‌ترین و ضروری‌ترین ژن در سازوکار مقاومت باکتری‌ها به ترکیبات مسی است (Ladomerskyab & Petris, 2015).

در سال‌های اخیر در مواردی نتایج رضایت بخشی از به‌کارگیری ترکیبات مسی در کنترل بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار به دست نیامده است و مورد شکایت باغداران بوده است (Amanifar, 2020a). همچنین گزارش‌های متعددی از وجود سویه‌های مقاوم *Pss* به یون Cu^{2+}از میزبان‌های مختلف وجود دارد (Spotts & Cervantes, 1995, Cazorla *et al*., 2002, Fan *et al*., 2022). امروزه با افزودن برخی ترکیبات و عناصر به ترکیبات مسی توانسته‌اند این چالش را مدیریت کنند (Scheck & Pscheidt, 1998). چون غلظت یون Cu^{2+}، نه مقدار کل مس در فرمولاسیون سم، تعیین‌کننده سمیت برای یاخته‌های باکتری است لذا بعید به نظر می‌رسد که با افزایش تعداد سم‌پاشی یا میزان سم اثر کنترلی جمعیت سویه‌های مقاوم *Pss* را بتوان بهبود بخشید (Scheck &

Pscheidt, 1998). در این پژوهش نیز غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سولفات مس تفاوت معنی‌داری با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازدارندگی رشد سویه‌های *Pss* روی محیط کشت نداشت (جداول ۴و ۵). یکی از مشکلات استفاده تنها از ترکیبات مسی گیاه‌سوزی آن‌ها در غلظت بالا است، لذا با فرمولاسیون‌های مناسب ضمن افزودن مواد با اثر هم‌افزایی این چالش در کاربرد این سموم، به‌ویژه برای بافت‌های نازک و لطیف گیاهی مدیریت شود.

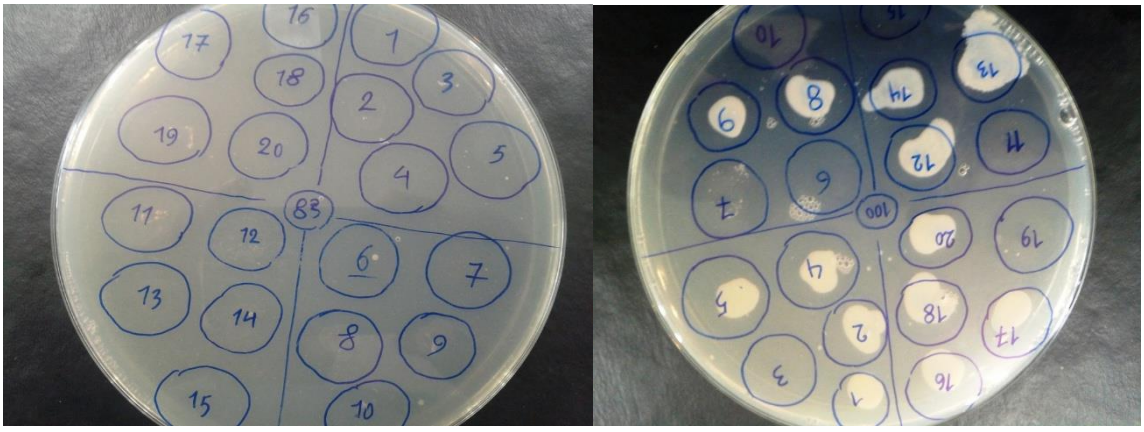
در پژوهشی در حاشیه زاینده رود تفاوت معنی‌داری بین فرمولاسیون‌های مختلف ترکیبات مسی با و بدون مانکوزب در کاهش میزان و شدت بیماری شانکر باکتریایی هلو وجود داشته است (Amanifar, 2020b). این احتمال وجود دارد که ترکیباتی همانند مانکوزب یون های مس را کلات می‌کنند، بنابراین یون های مس به مقدار بیشتر در دسترس قرار می گیرند و مکان های (sites) بیشتری از سلول‌های باکتریایی تحت تأثیر مس تخریب می‌شوند (Medhekar & Boparai, 1981). هیدروکسید مس و مانکوزب به تنهایی به اندازه کافی نتوانستند بیماری سوختگی باکتریایی برگ لوبیا ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* را کاهش دهند، اما مخلوط این دو مانع رشد باکتری در محیط کشت شده و در شرایط گلخانه نیز توانسته این بیماری را در لوبیا کنترل کند (Zhang *et al.*, 2017). در این پژوهش نیز سویه‌های مقاوم *Pss* در محیط کشت حاوی ترکیبات مسی (مخلوط بردو، اکسی کلرید مس، اکسید مس و کربوکسیلات مس) با درجات مختلف رشد کردند اما با افزودن یکی از ترکیبات مانکوزب، سولفات روی و سولفات آهن از رشد سویه‌های مقاوم جلوگیری شد.

افزودن آهن (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با فرم $FeCl_3.6\ H_2O$ به کوسید ۱۰۱ (Kocide 101) غلظت یون‌های آزاد CU^{2+} در محلول سم ۲۵ برابر افزایش داده و جمعیت *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* مقاوم به مس و بیماری سوختگی باکتریایی برگ گردو را به طور معنی‌داری در مقایسه با کوسید ۱۰۱ بدون آهن کاهش داد (Lee *et al.*, 1993). در این بررسی نیز افزودن سولفات آهن به محیط کشت حاوی ترکیبات مسی به طور معنی‌داری باعث بازدارندگی رشد سویه‌های مقاوم به مس *Pss* شد (جدول ۶).

بر اساس نتایج یک مطالعه تیمار محلول‌پاشی اوره روی درختان هلو با علائم شانکر باکتریایی میزان و شدت بیماری (اندازه شانکر) را ۲۸ درصد کاهش داد؛ همچنین ترکیب اوره با سموم مسی در مقایسه با استفاده تنها از این ترکیبات باعث کاهش معنی‌دار شدت و میزان شانکر شد (Amanifar, 2020b). اما در پژوهش حاضر در شرایط پتری (محیط کشت) افزودن اوره به همراه ترکیبات مسی در مقایسه با استفاده تنها از این ترکیبات به محیط کشت تاثیری در میزان بازداندگی رشد سویه‌های *Pss* نداشت (جدول ۵). لذا شاید بتوان گفت سازوکار اثر مثبت ازت (اوره) در شرایط باغ احتمالا در فیزیولوژی مقاومت گیاه به عامل شانکر است. چون سویه‌های بیماریزای *Pss* سیرینگومایسین تولید می‌کنند که در بیماریزایی و اندازه شانکر تاثیر دارد و تولید و ترشح آن توسط ژن *syrB* کنترل می‌شود، از طرفی وجود برخی از ترکیبات گیاهی مانند برخی قندها و فنل‌ها بیان این ژن را افزایش می‌دهد، در عوض نیتروژن موجود در تنه درختان باعث کاهش بیان *syrB* می‌شود. به طورکلی ترکیباتی که نسبت کربن به نیتروژن را در گیاه کاهش می‌دهند باعث ایجاد مقاومت علیه شانکر باکتریایی می‌شوند (Cao *et al.*, 2013). نتایج مشابهی توسط سایر محققین در محلول‌پاشی درختان هلو، بادام و آلو با نیتروژن و کاهش اندازه شانکر باکتریایی بدست آمده است (Cao *et al.*, 2013). علاوه بر این استفاده از ترکیبات ازته در خاک باعث کاهش جمعیت نماتدهای حلقه‌ای که با بیماری شانکر باکتریایی برهمکنش

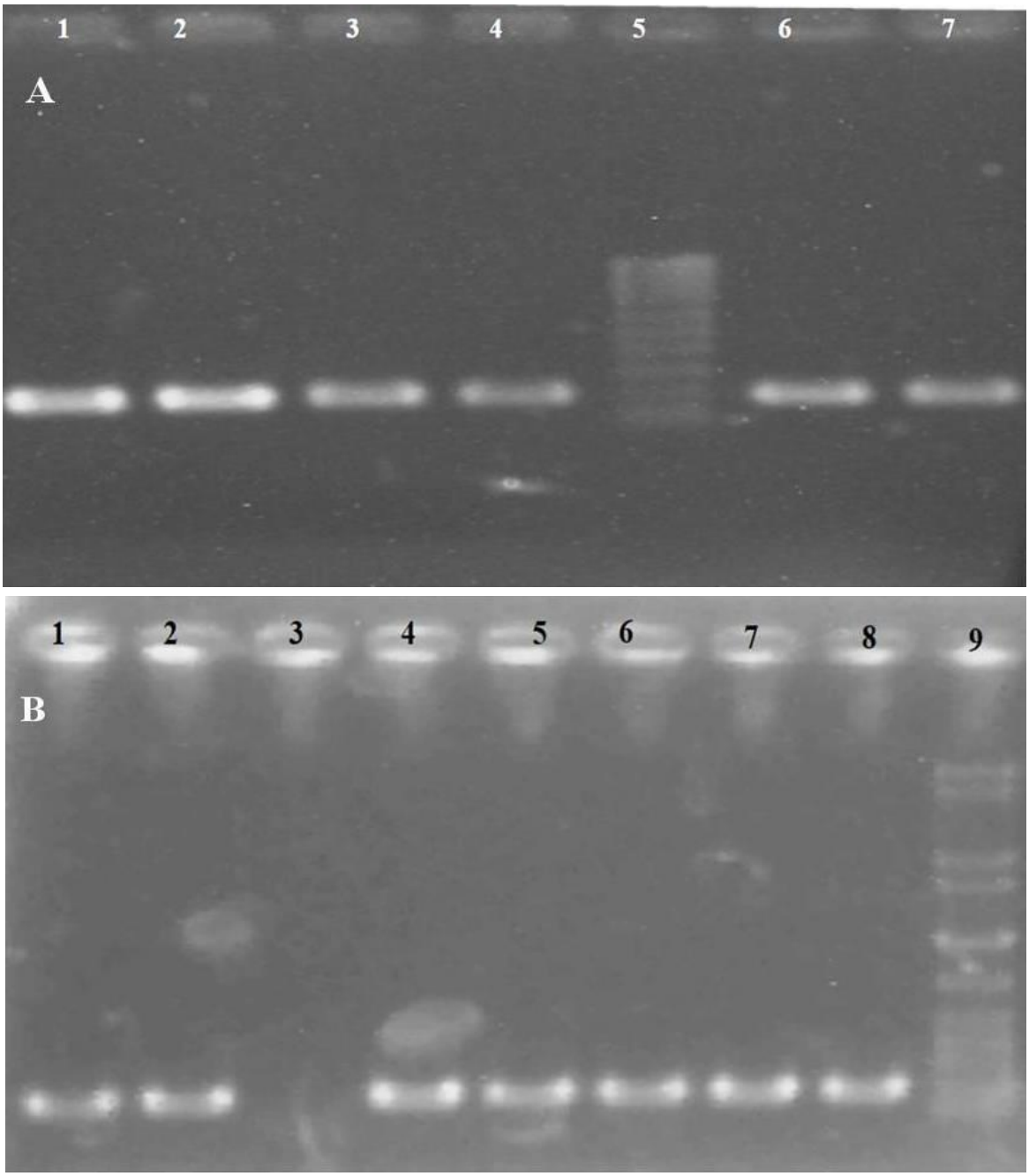
دارنـد می‌شـود (Mojtahedi *et al*., 1976). پژوهش‌هـای قبلی نیز در استان چهارمحال و بختیاری نشان می‌دهـد کـه جمعیـت بـالایی از نماتـدهای حلقـه‌ای در باغ‌هـای هلـو واکاری شده، که دارای علائم شدید شانکر هستند، مشاهده شـده اسـت و بـین نماتـد *Mesocriconema xenoplax* و *Pss* در ایجاد و شدت شانکر باکتریـایی هلـو بـرهمکنش وجود دارد (Amanifar, 2023).

نتیجه‌گیری کلی: بر اساس بررسی‌های میـدانی و نتـایج این پژوهش می‌توان گفت استفاده تنها از ترکیبات مسی در کنترل بیماری‌های باکتریـایی ناشـی از *Pss* نـه فقـط مـؤثر نیست، بلکه به دلیل وجود سویه هـای مقـاوم بـه مـس در *Pss* و احتمالا سایر بیمارگرهـای باکتریـایی باعـث حـذف جمعیت‌های باکتریایی حساس (به ویژه باکتری‌های مفید و غیر بیماریزا) به مـس شـده و آشـیان‌هـای اکولـوژیکی بـه تدریج توسط سویه‌های مقاوم اشغال می شود. ایـن پدیـده باعث افزایش فراوانی جمعیت سویه‌های بیمـاریزای مقـاوم به مس شده و به تبع آن بیماری‌های ناشی از چنین سـویه-هایی افزایش می‌یابد. لذا در کنار روش‌های غیـر شـیمیایی کنتـرل بیمـاری‌هـای باکتریـایی چـالش موجـود در روش شیمیایی (مقاومت به مس) نیز بایستی مـدیریت شـود، بـر اساس نتایج این پژوهش می‌توان فرمولاسیونی شامل یکـی از باکتری‌کش‌های مسی موجود در بازار به همراه اوره (سه در هزار) بعلاوه مانکوزب (دو در هزار) یا سـولفات روی (دو در هزار) یا سولفات آهن (دو در هزار) برای بیماری-های باکتریایی توصیه کرد.



شکل ۱- ارزیابی مقاومت سویه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به ترکیبات مسی در شـرایط محـیط کشـت، محیط کشت حاوی کربوکسیلات مس (تصویر سمت راست)، محیط کشت حاوی کربوکسیلات مس بعلاوه مانکوزب (تصویر سمت چپ).

Figure 1- Evaluation of the resistance of different isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* to copper compounds in culture medium. The right image shows culture medium containing copper carboxylate, while the left image shows culture medium containing copper carboxylate plus mancozeb.



شکل ۲- تکثیر ژن ***CopA*** (۱۹۶ جفت بازی) مسئول مقاومت به مس در سویه‌هـای ***Pseudomonas syringae* pv. *syringae***، (**A**): ۱، ۲، ۳ و ۴:سویه‌های هلو، ۵: مارکر(**1 kb, Cat. No: 305105, BIORON**)، ۶ و ۷: سویه‌های بادام. (**B**): ۱ و ۲: سویه‌های گیلاس، ۳ (سویه حساس خیار)، ۴ (سویه خیار)، ۵ و ۶ (سویه‌های گندم) و ۷ و ۸ (سویه‌های لوبیا) و ۹ مارکر (**1 kb**).

Figure 2- Amplification of the *CopA* gene (196 bp) responsible for copper resistance in isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. A: 1, 2, 3 and 4:peach isolates, 5 marker (1 kb, Cat. No: 305105, BIORON), 6 and 7 (almond isolates) B: 1 and 2: cherry isolates, 3 (a sensitive cucumber isolate), 4 (cucumber isolate), 5 and 6 (wheat isolates), 7 and 8 (bean isolate) and 9 markers (1 kb).

سپاسگزاری

این مقاله قسمتی از نتایج پروژه‌های تحقیقاتی شماره ۴-۴۲-۱۶-۰۸۳-۹۵۰۷۳۸ و ۲۴-۴۲-۱۶-۰۳۸-۹۹۰۲۳۷ مصوب سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی است که اعتبارات آن توسط سازمان جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری تأمین شده است، از سازمان فوق تشکر و قدردانی می‌شود. ازآقای دکتر فرود صالحی عضو هیات علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، به خاطر همکاری درتجزیه آماری داده‌ها سپاسگزاری می‌شود.

منابع

References

Aiello D., Ferrante P., Vitale A., Polizzi G., Scortichini and Cirvilleri M. G. 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in sicily and occurrence of copper-resistant strains. Plant Pathology 97(2): 273–282. DOI: 10.4454/JPP.V97I2.015

Agrios G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press: Burlington, Ma. USA.

Amanifar N. 2019. *Pseudomonas marginalis:* as a potential pathogen of greenhouse grown plants and crops with sprinkler irrigation. Iranian Journal of Plant Pathology (55): 87-104. (In Persian with English abstract). Doi: 10.22034/ijpp.2019.37317

Amanifar N. 2020a. Winter sunscald as a predisposing factor for bacterial canker of almond and peach trees in Chaharmahal va Bakhtiari province. Applied Entomology and Phytopathology 88: 113-123. (In Persian with English abstract). doi.org/10.22092/ jaep.2020.341697.1325

Amanifar N. 2020b. Evaluation of the Efficacy of Some Chemical Compounds in the Control of Peach Bacterial Canker. Journal of Pesticides in Plant Protection Sciences 9(1)*:* 11-26. (In Persian with English abstract). doi. 10.22092/jppps.2020.125441

Amanifar N. 2023. Synergistic effect of *Mesocriconema xenoplax* in the creation of bacterial canker of peach by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Iranian Journal of Plant Protection Science, 54 (2): 47-58. (In Persian with English abstract). doi.org/10.22059/IJPPS.2023.354890.1007020

Andersen G. L., Menkissoglou O. and Lindow S. E. 1991. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. Phytopathology 81:648-656.

Arnesano F., Banci L., Bertini I. and Thompsett A.R. 2002. Solution structure of *CopC*: a cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis. Structure 10(10): 1337–1347.

Bondarczuk K. and Piotrowska-Seget Z. 2013. Molecular basisof active copper resistance mechanisms in gram-negativebacteria. Cell Biology and Toxicology 29(6): 397–405. doi.10.1007/s10565-013-9262-1

Cao T., R.A. Duncan B.C. Kirkpatrick Shackel K.A. and Dejong T.M. 2013. Effect of calcium and nitrogen fertilization on bacterial canker susceptibility in stone fruits. Fruits 68: 245–254. doi.org/10.1051/fruits/2013071

Carvalho R., Duman K., Jones J.B. and Paret M.L. 2019. Bactericidal Activity of Copper-Zinc Hybrid Nanoparticles on Copper-Tolerant *Xanthomonas perforans*. Scientific Reports 9: 20124.https://doi.org/10.1038/s41598-019-56419-6

Cazorla F. M., Arrebola E., Sesma A., Pérez-García A., Codina J. C., Murillo J. and de Vicente A. 2002. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. Phytopathology 92:909-916. doi 10.1038/s41598-019-56419-6

Cha J.S. and Cooksey D.A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8915–8919

Conover R.A. and Gerhold N.R. 1981. Mixtures of copper and maneb or mancozeb for control of bacterial spot of tomato and their compatibility for control of fungus diseases. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 94*:* 154-156.

Fan X., Saleem T. and Zou H. 2022.Copper resistance mechanisms in plant pathogenic bacteria. Phytopathologia Mediterranea 61*:* 129-138. doi.org/10.36253/phyto-13282

Husseini A. and Akköprü A. 2020. The possible mechanisms of copper resistance in the pathogen

Pseudomonas syringae pathovars in stone fruit trees. Phytoparasitica 48:705–718. doi: 10.1007/s12600-020-00828-1

Ladomerskyab E. and Petris M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. Metallomics 7*:* 957–964. doi: 10.1039/c4mt00327f

Lamichhane J. R., Messéan A. and Morris C. E. 2015 . Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. Journal of General Plant Pathology 81*:* 331-50 DOI:10.1007/s10327- 015-0605-z

Lee Y.A., Schroth M. N., Hendson M.,Lindow S. E., Wang X.-L., Olson B.,Buchner R. P. and Teviotdale B. 1993. Increased toxicity of iron-amended coppercontaining bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis.* Phytopathology 83*:*1460-1465.

Lee S., Cheon w., Tae Kwon H., Lee Y., Kim J., Balaraju K. and Jeon Y. 2023. Identification and Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a causative bacterium of apple canker in Korea. Plant Pathology Journal 39(1): 88-107.

Malik A. and Jaiswal R. 2000. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16: 177–182.

Medhekar S. and. Boparai K.S 1981. Fungicidal bis (1-amidino-Oethylisourea) copper (II) carbamates. J. Agric. Food Chem 29*:* 421-422.

Menkissoglu O. and Lindow S. E. 1991. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. Phytopathology 81*:*1263-1270.

Mojtahedi H. and Lownsbery B.F. 1976. The effects of ammonia-generating fertilizer on *Criconemoides xenoplax* in pot cultures. Journal Nematology 8:306–309.

Montesinos E. and Vilardell P. 2001. Effect of bactericides, phosphonates and nutrient amendments on blast of dormant flower buds of pear: a field evaluation for disease control. European Journal of Plant Pathology, 107*:* 787–794. doi.org/10.1023/A:1012422116116

Nakajima M., Goto M. and Hibi T. 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. Journal of General Plant Pathology 68(1): 68–74. doi.org/10.1007/PL00013056

Parsons I. M. and Edgington L. V. 1991. The possible role of fixed coppers in combination with ethylene bis-dithiocarbamate for control of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato.* (Abstr.) Phytopathology 71:563.

Pernezny K., Nagata R., Havranek N. and Sanchez J. 2008. Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. Crop Protection 27: 256-262. 10.1016/j.cro pro.2007.05.012

Ritchie D. F. and Bennett M. H. 1991. Impact of copper and additives to copper on pepper yield in the presence of copper-sensitive and -resistant bacterial pathogen strains. Fungic. Nematicide Tests 47:105-106.

SAS. (2004). The SAS Systeme for windows 9.1 SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A.

Scheck H.J. and Pscheidt J.W 1998. Effect of copper bactericides on copper resistant and sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Disease 82*:* 397-406.

Spotts R. A. and Cervantes L. A. 1995. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. Plant Disease 79:1132-1135.

Sundin G. W., Jones A. L. and Fulbright D. W. 1989. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in-vitro and in planta with a plasmid. Phytopathology 79(8): 861–865.

Wimalajeewa D.L.S., Cahill R., Hepworth G., Schneider H.G. and Washbourne J.W. 1991. Chemical control of bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) of apricot and cherry in Victoria. Australian Journal of Experimental Agriculture 31: 705 – 708.

Zhang S., Fu, Y., Mersha Z. and Pernezny K. 2017. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. Crop Protection 98: 8-15. doi:10.1016/j.cropro.2017.03.009