



مقاله پژوهشی

ردیابی و شناسایی *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* عامل بیماری

باکتریایی سوختگی هاله ای لوبیا سبز

مریم ربیعی^{۱*} و مسعود بهار^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۶)

چکیده

در ماه‌های اسفند تا اردیبهشت سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰، در سطح غلاف‌های لوبیاسبز عرضه‌شده از مناطق جنوبی کشور به بازارهای اصفهان، لکه‌های مدور آبسوخته‌ای با حاشیه قهوه‌ای مشاهده شدند. از ۸۱ نمونه جمع‌آوری شده بطور مداوم یک باکتری فلورسنت‌کننده و دوکی‌شکل با حاشیه نامنظم جداسازی گردید. انگشت‌نگاری ژنتیکی با استفاده از آغازگرهای BOXIR و ERIC مشخص نمود که الگوی تکثیر محصول PCR این جدایه‌ها یکسان می‌باشد که با ویژگیهای بیوشیمیایی و بیماری‌گری آنها نیز مطابقت داشت. تکثیر قطعات DNA با اندازه‌های مورد انتظار در جدایه‌های منتخب، طی آزمون PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی، و تجزیه و تحلیل ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه 16SrDNA آنها نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به جنس *Pseudomonas* spp. هستند. در واکنش Nested-PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های تولیدکننده فازئولوتوکسین، قطعات DNA مورد نظر در جدایه‌ها تکثیر گردید که توالی آنها بیش از ۹۹٪ با جدایه‌های *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* مشابهت داشت. تحلیل فیلوژنی جدایه‌ها بر اساس توالی‌های ژن‌های خانه‌دار نیز این نتایج را تایید کرد. به این ترتیب، با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌ها، عامل بیماری آبسوختگی لکه‌ای لوبیاهای سبز وارداتی از جنوب کشور به اصفهان، باکتری Psp تشخیص داده شد. مدت ماندگاری این باکتری روی بذر در شرایط آزمایشگاهی، بیش از یک سال ارزیابی گردید. به دلیل بذر زاد بودن باکتری Psp، در صورت استمرار بارندگی‌های بهاره، احتمالاً طی سال‌های آتی نیز خسارت بیماری لکه‌هاله‌ای لوبیا در مناطق جنوبی کشور ادامه خواهد داشت.

کلمات کلیدی: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*، فازئولوتوکسین، بیمارگر بذرزاد، rep-PCR

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی mbahar@iut.ac.ir

۱ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان



DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021793.448

Research Article
Detection and Identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, the causal agent of the bacterial halo blight of snap bean

M. Rabie^{1*} and M. Bahar^{1}**

(Received: 16.02.2024; Accepted: 16.08.2024)

Abstract

In March-April of 2020-2022, round and water-soaked spots surrounded by a brown border were observed on the green bean pods delivered to the markets of Isfahan from the southern provinces of the country. A bacterium with a fluorescent appearance and a spindle-shaped structure with irregular edges was routinely isolated from the 81 specimens collected. The genetic fingerprinting employing rep-PCR revealed a resemblance between the PCR product profiles of the isolates, which is consistent with their pathogenic and biochemical characteristics. The PCR reaction of representative isolates produced the expected-size fragments of 16Sr DNA through genus-specific primer sets. Subsequent analysis of the sequences of the fragments confirmed the affiliation of the isolates with *Pseudomonas* spp. The expected-sized amplicons were amplified and sequenced in nested-PCR tests using phaseolotoxin gene based primer pairs. The results showed that the nucleotide sequences were 99% homologous to *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp). By conducting a phylogenetic analysis with sequences of housekeeping genes *gyrB* and *rpoD*, the isolates were clustered with reference strains of Psp, confirming their identity. Considering the isolates' morphological, biochemical and molecular characteristics, Psp was identified as the cause of halo blight disease in beans imported to Isfahan from the southern regions. In laboratory conditions, the persistence of the pathogen on seed was evaluated for more than one year. The long-term viability of Psp on seeds may lead to the ongoing prevalence of bean halo blight disease in the country in the forthcoming years, due to the cool and moist conditions resulting from spring rains.

Keywords: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, phaseolotoxin, seed borne pathogen, rep-PCR

* A part of Msc. Thesis of of the first author submitted to College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

** Corresponding author's E-mil: mbahar@iut.ac.ir

1 Msc. Student and Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

مقدمه

decarboxylase در چرخه اوره گیاه، باعث بلوکه شدن تولید آرژنین شده، در نتیجه سنتز کلروفیل II در سلول‌های مزوفیل برگ کاهش می‌یابد و به این ترتیب، در اطراف لکه‌ها زردی ایجاد می‌شود (Ferguson & Johnston 1980, Turner 1986). استرین‌های باکتری Psp به دو گروه دارای توانایی تولید فازئولوتوکسین (tox^+) و بدون توانایی تولید فازئولوتوکسین (tox^-) تقسیم می‌شوند (Prosen et al. 1993, Oguiza 2004, Rico et al. 2003) که هر دو استرین بیماری سوختگی هاله‌ای را ایجاد می‌کنند، با این تفاوت که در استرین‌های بیماری‌زای فاقد توانایی تولید توکسین، اطراف لکه‌های آبسوخته روی برگ یا غلاف، هاله زردرنگی وجود ندارد (Nobel et al. 2019). بر اساس مطالعات قبلی، دمای مناسب برای تولید بیشترین مقدار فازئولوتوکسین 18°C می‌باشد، در حالی که در دمای بالاتر این توکسین ردیابی نمی‌شود (Aguilera et al. 2017, Mitchell 1978).

باکتری Psp تا چندین سال می‌تواند به صورت اپی‌فیت در بذر لوبیا زنده بماند (Schwartz et al. 2005). این دوره ماندگاری در انبارهای کنترل شده بیشتر از چهار سال و در انبارهای کنترل شده (دمای 10°C - 7°C و رطوبت نسبی ۴۰٪ - ۵۰٪) شش تا ۱۰ سال ارزیابی شده است که گیاهان حاصل از رشد این بذرها می‌توانند به عنوان منبع بیماری در شرایط خنک (کمتر از 27°C) و مرطوب گسترش می‌یابد و در صورت تداوم شرایط، به صورت اپیدمی در می‌آید، در حالی که در آب و هوای نیمه‌گرمسیری و نیمه‌خشک شیوع کمتری دارد (Taylor et al. 1979b, Nobel et al. 2019).

طی ماه‌های اسفند تا اردیبهشت سال‌های اخیر (۱۳۹۸-۱۴۰۰)، در غلاف لوبیا‌های سبز عرضه شده به بازارهای مناطق شهری اصفهان، لکه‌های مدور آبسوخته‌ای مشاهده گردید که در بعضی موارد تعداد

بیماری سوختگی هاله‌ای یکی از بیماری‌های مهم لوبیا محسوب می‌شود که در اکثر کشورهای دنیا انتشار دارد (Schwartz et al. 2005, Arnold et al. 2011). عامل این بیماری، باکتری *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992 (Psp) متعلق به رده باکتری‌های Gammaproteobacteria می‌باشد که قبلاً به عنوان عضوی از مجموعه *P. syringae* تحت عنوان *P. syringae* pv. *phaseolicola* شناخته می‌شد (Young 2010, Bardaji et al. 2011). علیرغم انتشار باکتری Psp در ۵۰ کشور جهان از پنج قاره و اعلام قرنطینه بودن آن در بعضی از کشورها مانند چین، برزیل و اسرائیل، گزارشی از حضور این عامل بیمارگر در مزارع لوبیای ایران وجود ندارد (Dell'Olmo et al 2023). علاوه بر این، باکتری Psp تا سال ۲۰۲۱ در فهرست عوامل قرنطینه‌ای سازمان حفظ نباتات ایران قرار داشت و علیرغم در دسترس نبودن فهرست جدیدتر، بعید بنظر می‌رسد که از لیست عوامل بیمارگر قرنطینه‌ای خارج شده باشد ([www.ppo.ir/_douranportal/usersfiles/quarantine@pp\(o.ir_4172/documents](http://www.ppo.ir/_douranportal/usersfiles/quarantine@pp(o.ir_4172/documents)).

علایم بیماری سوختگی هاله‌ای لوبیا ابتدا به صورت لکه‌های آبسوخته اولیه کوچک در برگ‌های پایینی مشاهده می‌شود. با گذشت زمان این لکه‌ها بتدریج نکروز شده و رنگ قهوه‌ای به خود می‌گیرند. در بعضی مواقع، بافت اطراف این لکه‌ها به دلیل وجود یک فایتوتوکسین غیراختصاصی به نام فازئولوتوکسین هاله زردی پیدا می‌کند. در همین شرایط، لکه‌های آبسوخته مدوری روی غلاف‌های تشکیل می‌شود که به تدریج حاشیه قرمزی در آنها ظاهر می‌شود (Arnold et al. 2011, Sun et al. 2017). فازئولوتوکسین با جلوگیری از فعالیت دو آنزیم حیاتی *ornithine carbamoyl transferase* و *ornithine*

یک قطعه حدود نیم سانتی متر مربع از مرز بین بافت سالم و آلوده لکه های غلاف یا برگ نمونه جدا شد و قطعات پس از اتصال به یک گیره فلزی استریل، به صورت معلق در داخل لوله حاوی آب مقطر استریل غوطه‌ور گردیدند. پس از خروج ترشحات باکتریایی از نمونه‌ها، از سوسپانسیون های به دست آمده بطور همزمان به اندازه یک لوپ باکتریایی روی محیط های عمومی Nutrient Agar (NA) و Kings B medium (KB) به شکل خطی کشت شد و در انکوباتور با دمای 28°C قرار گرفت. پس از گذشت ۳۶-۴۸ ساعت، محیط های کشت در زیر بینوکلار بررسی گردیدند و نمونه شاخصی از کلنی های باکتریایی غالب در هر محیط کشت روی محیط KB خالص سازی شد.

برای تعیین توان بیماریزایی جدایه ها، ابتدا سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته آنها در آب مقطر استریل در حدود 10^7-10^8 CFU/mL ($\text{OD}_{600} = 0.1$) تهیه شد. این سوسپانسیون توسط سرنگ انسولین به شکل زیرپوستی به اپیدرم غلاف لوبیاسبز تزریق شد. غلاف های تلقیح شده به همراه غلاف تزریق شده با آب مقطر استریل (شاهد منفی) به مدت یک هفته درون دسیکاتور محتوی آب و در دمای 28°C نگهداری شدند و سپس بروز بیماری در آنها بررسی شد.

از تمام جدایه های باکتریایی بیمارگر روی غلاف لوبیا که در محیط KB حالت فلورسنت داشتند، سوسپانسیون غلیظی در یک میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد و به کرایوتیوب حاوی 500 میکرولیتر گلسیرین استریل انتقال یافت. پس از ورتکس کردن محتویات لوله، کرایوتیوب در نیتروژن مایع به سرعت منجمد شد و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر 80°C - منتقل گردید.

آزمون بیماریزایی جدایه ها

برای آزمون بیماریزایی روی برگ لوبیا، ابتدا بذرهای

لکه ها و شدت آبسوخنگی آنها بسیار زیاد بود. بنابر اظهار فروشندگان، این لوبیاهای سبز از مناطق جنوبی کشور مانند شهرهای میناب و بندرعباس در استان هرمزگان، کازرون در استان فارس و جیرفت در استان کرمان وارد بازارهای استان اصفهان شده بودند. با قرار دادن بافت های آلوده غلاف ها در آب مقطر، ترشحات باکتریایی (Ooze) از آنها در آب جریان پیدا کرد که نشان دهنده باکتریایی بودن عامل بروز لکه ها بود. به این ترتیب، احتمال داده شد که یک عامل باکتریایی سازگار با شرایط مرطوب و معتدل مطابق با ایام بارندگی در اواخر زمستان یا اوایل بهار مناطق جنوبی کشور در بروز این بیماری دخالت دارد که در شرایط گرم و کم رطوبت اصفهان در بهار و تابستان امکان فعالیت آن فراهم نیست. به این لحاظ، هدف اصلی این تحقیق، شناسایی دقیق عامل بیماری لکه باکتریایی غلاف لوبیاسبز وارداتی به اصفهان و نیز امکان بذر زاد بودن آن تعیین شد.

مواد و روش های بررسی

نمونه برداری و جداسازی جدایه های باکتریایی

در ماه های اسفند، فروردین و اردیبهشت سال های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰ و آبان ۱۴۰۰، از سبزی فروشی های سطح شهر اصفهان بازدید شد. نمونه هایی از غلاف های لوبیاسبز دارای علائم لکه های آبسوخته و نیز برگ های متصل به بعضی از آنها که لکه های آبسوخته یا نکروز خاکستری یا قهوه ای، گاهی همراه با هاله زرد در حاشیه لکه ها داشتند، جمع آوری گردید. پس از ثبت علائم نمونه ها، جداسازی و شناسایی عامل بیماری از هر نمونه به طور مجزا در آزمایشگاه انجام گرفت.

ابتدا سطح برگ ها و غلاف های مبتلا به سوختگی لکه ای با محلول وایتکس ۱٪ تجارتي به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی شد و سپس نمونه ها دو بار با آب مقطر استریل شستشو یافتند. به وسیله یک اسکالپل استریل

گرفت (Murray & Thompson 1980). پس از اطمینان از کمیت و کیفیت نمونه های DNA استخراج شده به روش الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ در بافر Tris- acetate- EDTA (TAE) و مقایسه تراکم باندها با باندهای نشانگر Lader 100 (سیناژن)، آزمون های PCR مورد نظر برای تکثیر DNA نمونه ها با جفت آغازگر های عمومی و اختصاصی انجام گرفت.

در تمامی واکنش‌های مربوط به PCR، از مخلوط Taq DNA polymerase 2.0x Master Mix Red (Ampliqon Co., Denmark) استفاده شد. به منظور جلوگیری از تبخیر مواد واکنش یک قطره روغن معدنی استریل (حدود ۲۰ میکرولیتر)، به هر کدام اضافه گردید. محصول PCR نمونه ها روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شدند. از Ladder plus 100bp و بارگذاری آن در کنار نمونه‌ها، به عنوان مقیاس تخمین اندازه قطعات تکثیر شده PCR استفاده شد. ژل الکتروفورز به منظور رنگ آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برمایید (۱۰ mg/L) و سپس، جهت شستشوی رنگ اضافی به مدت دو دقیقه درون آب مقطر قرار گرفت. برای مشاهده قطعات تکثیر شده، ژل تحت اشعه ماورای بنفش (UV transilluminator (Vilber E-BOX, France) قرار داده شد و عکس برداری از آن صورت گرفت.

آزمون rep-PCR

به منظور انگشت نگاری ژنتیکی جدایه‌ها، از جفت آغازگرهای BOXA1R و ERIC2F/ERIC1R (Versalovic *et al.* 1994) استفاده شد (جدول ۱). حجم هر کدام از واکنش های PCR در حد ۲۵ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر DNA نمونه، ۷/۵ میکرولیتر مخلوط Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED، ۰/۷۵ میکرولیتر (یک پیکو مول) از هر آغازگر ERIC1R/ERIC2F (۱/۵ میکرولیتر در مورد BOXA1R) و ۱۱ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استریل بود. تکثیر DNA با آغازگرهای BOXA1R و ERIC با دستگاه BioRAD

لوبیای سفید درون گلدان‌های حاوی خاک سبک (مخلوط دو قسمت کوکوپیت، دو قسمت پیت ماس، یک قسمت پرلیت و یک قسمت ورمی کمپوست) اتوکلاو شده کاشته شدند. در مرحله سه برگی بوته‌ها، سوسپانسیون در حدود $10^8 - 10^7$ CFU/mL از کلنی های ۲۴ ساعت رشد کرده ۱۲ جدایه شاخص جمع آوری شده از برگ یا غلاف از مناطق مختلف در محیط KB تهیه گردید. سوسپانسیون هر جدایه به روش مالش با قلم مو بر روی دو برگ از هر بوته مایه زنی گردید. در این آزمایش از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد و گلدان‌ها به مدت سه هفته در گلخانه با دمای $35^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند.

تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی لوبیا

تمام جدایه های بدست آمده از نظر مرفولوژی کلنی ها روی NA، NAE، (مخلوط NA خنک شده با سفیده تخم مرغ) (Garibaldi 1967) و KB مورد بررسی قرار گرفتند. برای همه جدایه ها، آزمون های LOPAT شامل تولید لوان روی محیط NA محتوی ۵٪ سوکروز، اکسیداز، لهیدگی روی برش های سیب زمینی، هیدرولیز آرژنین و فوق حساسیت بر روی توتون انجام شد (Lelliott *et al.* 1966). برای سایر آزمون های کلاسیک باکتری شناسی، ۱۲ جدایه منتخب حداقل دو مرتبه تحت آزمون های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، تولید ایندول، تبدیل نیترات به نیتريت، هیدرولیز Tween80 و نشاسته، ذوب ژلاتین، تجزیه اسکولین و نیز استفاده از کربوهیدرات های گلوکز، ساکارز، آرابینوز، لاکتوز، سلویوز، آرابینوز، ملیبوز، رابینوز، تری هالوز، اریتریتول، مانیتول، سوربیتول و اینوسیتول قرار گرفتند (Schaad *et al.* 2001).

روش‌های شناسایی مولکولی

استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته جدایه های منتخب روی محیط NA به روش موری و تامسون (CTAB) انجام

نوکلئوتیدی از هر جدایه از طریق برنامه BLAST داده های NCBI تجزیه و تحلیل گردید. (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) در مقایسه با

جفت آغازگرهای اختصاصی جنس *Pseudomonas*

برای تعیین جنس جدایه های باکتریایی لوبیا، از آزمون PCR با به کار گیری جفت آغازگرهای اختصاصی جنس *Pseudomonas* شامل دو جفت آغازگر PA-GS-F/PA-PS-F/PS- GS-R (Spilker et al. 2004) و جفت آغازگر R (Widmer, et al. 1998) که استفاده شد (جدول ۱) که هر دو جفت آغازگر بر مبنای توالی ناحیه 16S rDNA طراحی شده اند. مخلوط واکنش PCR برای هر کدام از آزمون ها با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر 2× Taq DNA Master Mix، ۲۰ پیکومول از هر کدام از آغازگر های رفت و برگشت (۱ میکرولیتر)، پنج میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز و سه میکرولیتر DNA بود.

thermal cycler مطابق با شرایط مندرج در جدول ۱ صورت گرفت. ده میکرولیتر از هر محصول PCR در چاهک های ژل آگارز تهیه شده در بافر Tris-borate-EDTA buffer (TBE) با جریان ۹۰ میلی آمپر در هر دقیقه الکتروفورز شد.

آزمون PCR جدایه ها با جفت آغازگر عمومی پروکاریوت ها و توالی یابی محصول PCR

برای شناسایی اولیه جدایه های باکتریایی، ناحیه 16SrDNA تعداد ۱۲ نماینده از جدایه ها در آزمون PCR با جفت آغازگر عمومی 27F/1492R (Frank et al. 2008) تکثیر شد (جدول ۱). پس از مشاهده باندهای یکسان در تمام جدایه ها، قطعه DNA بدست آمده از دو نماینده (جدایه غلاف لوبیا- هرمزگان) و Psp91 (جدایه برگ- کازرون) تعیین توالی نوکلئوتیدی شد (شرکت پیشگام - تهران). پس از حذف نواحی نامناسب ابتدا و انتهای توالی های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار chromas version 2.6.6، یک توالی حدود ۱۰۰۰

جدول ۱- آغازگرها و شرایط PCR مورد استفاده در این تحقیق برای شناسایی *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

Table 1. Primers name, sequence, PCR product size and PCR conditions for the identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

Primer	Primer sequences	Amplicon length (bp)	PCR cycling conditions
BOX1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG		95°C 7'; 30× [94°C 60", 53°C 60", 65°C 8']; 65 °C 16'
ERIC2F ERIC1R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAG ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC		95°C 5'; 30× [94°C 60", 52°C 60", 65°C 5']; 65 °C 8'
27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTACGGCTACCTTGTACGA	1451	96°C 4'; 30× [94°C 60", 57°C 60", 72°C 60"]; 72 °C 10'
PS-F PS-R	GGTCTGAGAGGATGATCAGT TTAGCTCCACCTCGCGGC	1018	94°C 3'; 30× [94°C 60", 60°C 60", 72°C 60"]; 72 °C 10'
PA-GS-F PA-GS-R	GACGGGTGAGTAATGCCTA CACTGGTGTCTTCCTATA	618	94°C 5 ' ; 35× [95°C 60", 65°C 45", 72°C 60"]; 72 °C 10'
P5.1 P3.1	AGCTTCTCTCAAAACACCTGC TGTTCCGAGAGGCAGTCATG	502	94°C 2'; 25× [94°C 60", 58°C 60", 72°C 120"]; 72 °C 8'
P5.2 P3.2	TCGAACATCAATCTGCCAGCCA GGCTTTATTATTGCCGTGGGC	450	94°C 2'; 25× [94°C 60", 58°C 60", 72°C 120"]; 72 °C 8'

روابط فیلوژنتیکی دو جدایه شاخص Psp26 و Psp91 این پژوهش با تعدادی از جدایه‌های Psp ثبت شده در بلاست و همچنین گونه‌های نزدیک به آن در داخل جنس *Pseudomonas* بررسی شد. به این منظور، با استفاده از جفت آغازگرهای توصیه شده (Yamamoto et al. 2000,)، *gyrB* (UP-) (Mulet et al. 2009) برای تکثیر دو ناحیه ژنی *rpoD* (1E/AprU) و *rpoD* (PsEG30F/PsEG790R) جنس *Pseudomonas* (جدول ۱)، بخشی از نواحی ژنی *gyrB* و *rpoD* جدایه‌های Psp 26 و Psp91 تکثیر و توالی‌یابی شد (نیازن- تهران). پس از ویرایش ابتدا و انتهای توالی‌های دریافت شده، دو توالی *gyrB* و *rpoD* هر جدایه به هم وصل شدند (Concatenated) و با توالی‌های به هم پیوسته این دو ناحیه ژنی در گونه‌های نزدیک به Psp در جنس *Pseudomonas* برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی به کار رفتند. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار Mega V 7.0 به روش maximum-likelihood با استفاده از مدل Tamura 3-parameter+6 (T92+6) و اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گرفت.

تعیین بذرزاد بودن باکتری

برای تعیین ماندگاری باکتری در بذر لوبیا، جدایه شاخص باکتری این پژوهش (Psp26) به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۲۸ °C روی محیط کشت KB رشد داده شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری در حدود ۱۰^۹ CFU/mL (OD₆₀₀=1.2) در آب مقطر استریل تهیه گردید و به غلاف‌های سالم لوبیا تزریق گردید. غلاف‌های آلوده شده به مدت یک هفته درون دسیکاتور با رطوبت بالا قرار گرفتند. پس از بروز آبسوختگی و پیشرفت بیماری به صورت به هم پیوستگی لکه‌ها و متعاقب آن لزج شدن سرتاسری غلاف، همه بذرها داخل غلاف‌ها خارج و در شرایط آزمایشگاه خشک شدند. ردیابی باکتری در بذرها بدست آمده، ابتدا در فواصل زمانی صفر، دو، چهار، هشت، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ روز صورت گرفت. به این منظور، در هر نوبت با سه

شناسایی گونه جدایه‌ها با استفاده از روش Nested-PCR (PCR آشیانه‌ای)

برای شناسایی دقیق‌تر جدایه‌ها، از توالی‌یابی قطعه DNA تکثیرشده با جفت آغازگرهای معرفی شده برای ژن فازئولوتوکسین (P_{5.1}/P_{3.1} و P_{5.2}/P_{3.2}) در آزمون Nested-PCR استفاده شد (Schaad, et al. 2001). در مرحله اول، قطعه ۵۰۰ نوکلئوتیدی مورد نظر از ژن فازئولوتوکسین ۱۲ جدایه شاخص با استفاده از جفت آغازگر P_{5.1}/P_{3.1} PCR در یک واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتری از مخلوط واکنش (دو میکرولیتر DNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر ۲۰ pmol، ۱۰ میکرولیتر میکرولیتر 2× Taq DNA Master Mix و هفت میکرولیتر آب استریل عاری از نوکلئاز) تکثیر شد. محصول PCR به دست آمده از این مرحله به میزان ده برابر رقیق شد و واکنش مرحله دوم PCR با همان شرایط واکنش اول و با استفاده از جفت آغازگر P_{5.2}/P_{3.2} صورت گرفت. محصول PCR هر دو مرحله روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE به مدت چهار ساعت تحت جریان الکتریکی ۵۰ ولت الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل و مشاهده باندهای DNA به همان روش قبلی صورت گرفت. برای اطمینان از ردیابی ژن فازئولوتوکسین در این بررسی، قطعات DNA تکثیر شده دو جدایه منتخب Psp26 و Psp91 توالی‌یابی شدند (آزمایشگاه جامع تحقیقات - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان). پس از بررسی اطلاعات توالی دریافتی، با استفاده از نرم افزار chromas version 2.6.6، ابتدا و انتهای توالی نوکلئوتیدی که کیفیت مناسبی نداشتند حذف گردید و سپس میزان شباهت توالی نمونه‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن از طریق برنامه BLAST مقایسه گردید.

تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های Psp

برای تایید نتایج بدست آمده از شناسایی Psp به عنوان عامل بیماری لکه‌هاله ای لوبیا در استان‌های جنوبی،

۱۴۰۰، در لوبیاهای سبز تولید شده در مناطق جنوبی کشور مانند بندرعباس، میناب، جیرفت و کازرون که به بازارهای سبزی اصفهان عرضه شده بوند، علائم بارز آبسوختگی لکه‌ای در غلاف‌ها و برگ‌های متصل به آنها مشاهده شد (شکل ۱). علائم آبسوختگی لکه‌ای غلاف‌ها در بعضی موارد محدود و شامل یک تا پنج لکه در هر غلاف بود، ولی در موارد شدید آلودگی، لکه‌ها اکثر سطح غلاف را پوشانیده بودند. در حالت پیشرفته بیماری، حاشیه‌ای ارغوانی اطراف بعضی از لکه‌ها را احاطه کرده بود و مرکز لکه لزج شده و نکرور قهوه‌ای داشت. اگر چه تعداد غلاف‌های آلوده به بیماری در هر محموله لوبیاسبز متغیر بود و بطور تخمینی تعداد غلاف‌های آلوده کمتر از ۱٪ ارزیابی شد، ولی گاهی علائم بیماری در تعداد زیادی از غلاف‌های محموله لوبیا (حدود ۱۰٪ تا ۲۰٪) مشاهده گردید. در تمام سال‌های جمع‌آوری نمونه، دوره فراوانی بیماری، نسبت مستقیمی با بارش‌های بهار استان‌های جنوبی کشور داشت و پس از روزهای پرباران در استان‌های هرمزگان، فارس و کرمان، محموله‌های لوبیاسبز عرضه شده به بازار اصفهان از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند.

تکرار، یک بذر در شیشه‌های مک کارتنی محتوی پنج میلی‌لیتر بافر نمکی (PBST) استریل شده محتوی فسفات منو پتاسیم، فسفات دی پتاسیم، ۸/۵ گرم نمک کلورسدیم و دو میلی‌لیتر Tween 20 (pH 7.2) در یک لیتر آب مقطر استریل غوطه ور شد و لوله‌ها به مدت ۱۸ ساعت روی شیکر با تکانه ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ °C نگهداری شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر لوله به کمک میله خمیده شیشه‌ای استریل شده با شعله روی محیط KB پخش شد. پس از نگهداری ۴۸ ساعته محیط‌های کشت در ۲۸ °C، ویژگی کلنی‌های رشد کرده در محیط از نظر مورفولوژی، ایجاد رنگیزه فلورسنت تحت نور ماورای بنفش ۳۶۶ nm و توان بیماری‌زایی آنها با تزریق نقطه‌ای سوسپانسیون ۲۴ ساعت کشت شده باکتری در روی غلاف و آزمون Nested-PCR با جفت آغازگرهای P_{5.1}/P_{3.1} و P_{5.2}/P_{3.2} انجام گرفت. پس از مرحله اول آزمایشات، فرایند ردیابی باکتری از بذور مورد آزمایش بطور متوالی در مقاطع زمانی یک ماهه ادامه یافت.

نتایج

طی ماه‌های اسفند تا اردیبهشت سال‌های ۱۳۹۸ تا



شکل ۱- علائم خسارت بیماری لکه‌هاله‌ای با تشکیل لکه‌های آبسوخته و بروز بلایت در برگ‌ها و غلاف‌های لوبیاهای مناطق جنوبی کشور جمع‌آوری شده از مراکز فروش اصفهان

Fig 1. Characteristic symptoms of bean halo blight disease include the formation of water-soaked lesions followed by necrosis on the leaves and pods of beans collected from greengrocers in Isfahan

جداسازی و کشت نمونه‌های جمع‌آوری شده

از کشت ترشحات باکتریایی (Ooze) بافت آلوده لوبیاهای دارای علائم بیماری سوختگی غلاف و برگ در آب، یک نوع کلنی باکتریایی شیری‌رنگ، دوکی شکل، با مرکز برآمده و حاشیه مضرس بطور غالب در محیط‌های کشت NA رشد کرد. این کلنی هادر محیط KB و تحت تاثیر نور اشعه ماورای بنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر رنگ فلورسنت آبی (احتمالاً از نوع pyocyanin) نشان دادند که از ویژگی‌های مشخص باکتری‌های *Flourescent Pseudomonads spp.* می‌باشد. میزان درخشندگی فلورسنت جدایه‌ها در محیط NAE به مراتب بیشتر بود. در مجموع از ۹۸ نمونه جمع‌آوری شده از غلاف و برگ لوبیا، ۸۱ جدایه باکتریایی خالص سازی گردید که برای ادامه آزمایشات در فریزر -80°C نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی روی غلاف و برگ لوبیا

در آزمون بیماری‌زایی، تمام جدایه‌ها قادر بودند پس از گذشت دو روز، لکه‌های کوچک آسوخته‌ای در محل تزریق

روی غلاف ایجاد کنند که تا روز پنجم، لکه‌ها به تدریج به حداکثر اندازه خود رسیدند و در نگهداری طولانی مدت حالت لزج و حاشیه قرمز پیدا کردند (شکل ۲). برای تایید نتایج بیماری‌زایی، از لکه‌های ایجاد شده روی غلاف‌های مایه زنی شده، به روش قبلی روی محیط‌های NA و KB کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت، با مقایسه مورفولوژی و توانایی تولید رنگ فلورسنت جدایه‌ها در محیط KB، معلوم شد که باکتری‌های به‌دست‌آمده کاملاً مشابه همان جدایه‌های تزریق شده می‌باشند.

در آزمون بیماری‌زایی شش جدایه شاخص Psp21، Psp26، Psp68، Psp71، Psp78 و Psp91 روی برگ‌های لوبیا، اولین علائم بیماری طی ۱۰ روز پس از مایه‌زنی به‌صورت ظهور لکه‌های ریز آسوخته در مناطق تلقیح شده مشاهده شد. پس از ۱۵ روز این لکه‌ها حالت نکروز نشان دادند و زردی موضعی در سطح برگ ظاهر شد، درچنین شرایطی برگ‌های تلقیح شده با آب مقطر علامتی نشان ندادند (شکل ۲).



شکل ۲- علائم بیماری‌زایی جدایه BHB26 روی برگ (۱۵ روز) و غلاف‌های لوبیا سبز (۵ روز) در شرایط گلخانه ای

Fig 2. Pathogenicity tests of isolate BHB26 on leaves (15 days) and pods (5 days) of beans under greenhouse conditions

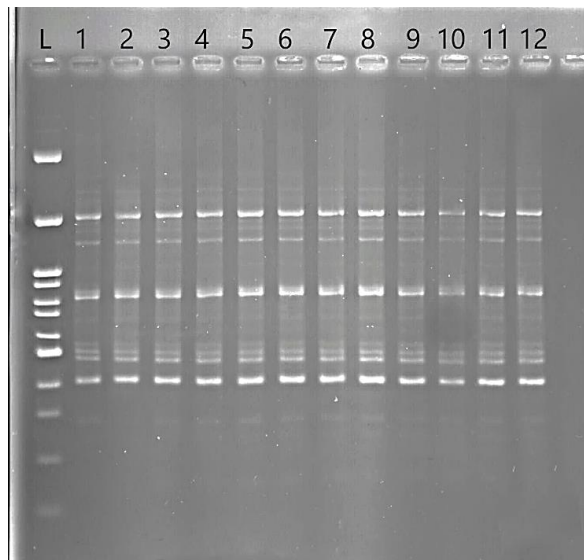
کردند که نشان‌دهنده واکنش مثبت برای تولید لوان بود. این جدایه‌ها در مدت کمتر از ۱۸ ساعت در برگ‌های توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد کردند، ولی واکنش اکسیداز،

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها طی آزمون‌های LOPAT، تمام جدایه‌های جمع‌آوری شده در محیط محتوی ساکارز، کلنی‌های لعاب‌دار تولید

تعیین شباهت ژنتیکی جدایه ها با استفاده از آزمون های ERIC-PCR و BOX-PCR

برای تعیین شباهت یا تنوع ژنتیکی احتمالی در بین جدایه ها، از انگشت نگاری ژنتیکی به روش های BOX-PCR و ERIC-PCR استفاده شد. در آزمون ERIC، همه جدایه ها، هفت باند مشخص با طول تقریبی ۱۰۰۰ bp - ۴۰۰ bp تولید کردند، ولی قطعات با تراکم ضعیف در اندازه های پایین تر از ۳۰۰bp نیز وجود داشت (شکل ۳). در هر حال الگوی تکثیر DNA برای تمام جدایه ها کاملاً یکسان بود و بنظر رسید تمام آنها به لحاظ الگوی باندها کاملاً مشابه هستند. تکثیر ژنومی جدایه ها با آغازگر BOX1R نیز نشان دهنده تشابه ژنتیکی آنها بود. در پروفیل هر جدایه ۱۱ باند نزدیک به هم با طول قطعات بین ۱۰۰۰ bp - ۴۰۰bp مشاهده شد که یکسانی الگوی تکثیر DNA آنها را نشان داد. با توجه به شباهت الگوی تکثیر DNA جدایه ها در هر دو آزمون BOX-PCR و ERIC-PCR، نتیجه گیری شد که جدایه های مورد بررسی اختلاف ژنتیکی قابل توجهی ندارند.

ایجاد لهدگی در برش های سیبزمینی و هیدرولیز آرژنین برای آنها منفی بود. با توجه به نتایج توان بیماریگری، خصوصیات مورفولوژیکی و آزمون های LOPAT، وابستگی جدایه های بدست آمده از لوبیاهای سبز مبتلا به سوختگی هاله ای به جنس *Pseudomonas* مشخص گردید. در ادامه آزمایشات، ویژگی های بیوشیمیایی شش جدایه شاخص Psp91 و Psp78، Psp71، Psp68، Psp26، Psp21 بررسی شد و معلوم گردید که این جدایه های گرم منفی به لحاظ آزمون های کاتالاز و تولید اسید از مصرف کربوهیدراتهای گلوکز، سوکروز، آرابینوز، سلوبیوز واکنش مثبتی دارند. در مقابل، نتایج هیدرولیز آرژنین، تجزیه آسکولین، احیای نیترات به نیتريت، هیدرولیز توئین ۸۰ و نشاسته، رشد در دمای ۳۷°C، مصرف ژلاتین و تولید ایندول برای آنها منفی بود. همچنین، این جدایه ها قادر نبودند از کربوهیدراتهای لاکتوز، تری-هالوز، ملی بیوز، رافینوز، اریتریتول، سوربیتول، مانیتول و اینوسیتول اسید تولید نمایند.



شکل ۳- نقوش انگشت نگاری ژنتیکی DNA ژنومی نماینده هایی از جدایه های باکتریایی بدست آمده از برگ و غلاف گیاهان لوبیای مبتلا به بلایت هاله ای در آزمون ERIC-PCR

Fig 3. Genomic DNA fingerprint patterns of a representative bacterial strain isolated from halo-blight infected leaves and pods of bean plants using the ERIC-PCR technique

انجام واکنش PCR با جفت آغازگر عمومی پروکاریوت‌ها و توالی‌یابی جدایه‌ها

در آزمون PCR با استفاده از 27F/1492R به عنوان جفت آغازگر عمومی پروکاریوت‌ها، یک باند DNA حدود ۱۴۰۰ bp در جدایه‌ها تکثیر شد. با توالی‌یابی نوکلئوتیدی رفت و برگشت باند DNA مزبور در جدایه شاخص Psp26 و تطبیق توالی بدست آمده با داده‌های موجود در BLAST معلوم شد که این توالی جدایه Psp26 (Accession No: PP983233) به توالی بخشی از توالی 16S rDNA اعضای جنس *Pseudomonas* از جمله *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (Accession No: CP000058.1) شباهت ۱۰۰٪ دارد. به این ترتیب مشخص گردید جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق متعلق به *Pseudomonas* spp. می‌باشند.

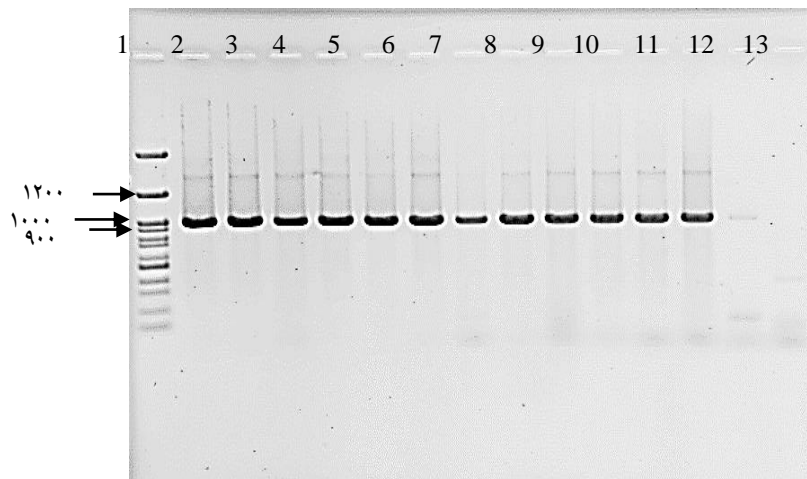
انجام واکنش PCR با استفاده از جفت‌آغازگرهای اختصاصی جنس سودوموناس

در ادامه تشخیص جنس جدایه‌های باکتریایی عامل بیماری لکه هاله ای لوبیا در پهنه جنوبی کشور، آزمون PCR آنها با جفت آغازگرهای اختصاصی جنس *Pseudomonas* شامل PA-GS-F/PA-GS-R و PS-F/PS-R صورت گرفت. با استفاده از جفت آغازگر PA-GS-F/PA-GS-R، تک باند موردانتظار (حدود ۶۱۸ bp) در محصول PCR همه جدایه تکثیر شد. طی PCR با جفت آغازگر PS-F/PS-R نیز جدایه‌ها یک قطعه DNA اختصاصی ۱۰۱۸bp تولید نمودند. با توجه به اختصاصی بودن این جفت آغازگرها برای تشخیص انحصاری اعضای جنس *Pseudomonas* و تکثیر باند منفرد اختصاصی در حدود اندازه‌های مورد انتظار برای هر دو جفت آغازگر، فرض قبلی تعلق جدایه‌های بدست آمده از لوبیاهای مبتلا به لکه هاله ای از مناطق جنوبی کشور به *Pseudomonas* spp. تایید شد.

انجام واکنش Nested-PCR با جفت آغازگر اختصاصی تولید ژن فازئولوتوکسین

پس از تایید جنس جدایه‌ها، برای تعیین گونه آنها از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌های فازئولوتوکسین در آزمون PCR دو مرحله‌ای (nested PCR) استفاده شد. در مرحله اول این واکنش، با جفت آغازگر P_{5.1}/P_{3.1} قطعه‌ای با طول باند موردانتظار حدود ۵۰۲ bp تکثیر گردید. با رقیق‌سازی محصول PCR مرحله اول به نسبت ۱:۱۰، مرحله دوم PCR با استفاده از جفت آغازگر P_{5.2}/P_{3.2} انجام گرفت که حاصل آزمون، تولید باندهای مترکم و مشخص با طول موردانتظار ۴۵۰bp در جدایه‌ها بود (شکل ۴).

پس از تکثیر باند موردنظر در جدایه‌ها، محصول واکنش PCR جدایه شاخص BHB26 با جفت آغازگر P_{5.1}/P_{3.1} تعیین توالی گردید و با شماره دسترسی PP998298 در NCBI ثبت گردید. میزان شباهت توالی مزبور با توالی نمونه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه BLAST بررسی شد که نتیجه آن شباهت ۱۰۰٪ توالی این جدایه با جدایه‌های دو پاتوار *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* و *P. savastanoi* pv. *actinidia* بود. مطابقت کامل توالی قسمتی از ناحیه ژنی فازئولوتوکسین در جدایه Psp26 با دو پاتوار *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (لوبیا) و *P. savastanoi* pv. *actinidia* (کیوی) نشان داد که در جدایه‌های باکتریایی لوبیای این پژوهش، ژن‌های حفاظت‌شده (conserved) فازئولوتوکسین وجود دارد و از آنجایی که *P. savastanoi* pv. *actinidia* قادر به ایجاد بیماری در لوبیا نیست و منحصراً به‌عنوان پاتوار کیوی شناخته می‌شود، به احتمال زیاد جدایه‌های لوبیای این تحقیق، متعلق به *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* می‌باشند.



شکل ۴- تکثیر قطعه 16SrDNA از جدایه های بیمارگر باکتریایی عامل لکه هاله ای لوبیای این پژوهش با جفت آغازگر اختصاصی جنس *Pseudomonas* PS-F/Ps-R (باند مورد انتظار 1018 bp)

Fig.4 PCR amplification of 16SrDNA fragment from pathogenic bacterial isolates causing bean halo blight with *Pseudomonas* genus- specific primer pair PS-F/Ps-R (expected band 1018bp)

مربوط به گونه های *P. syringae* و *P. tremae* تفکیک شد. در این بررسی، باکتری *P. fluorescens* ATCC 13525 به عنوان outgroup در یک گروه کاملاً جدا قرار گرفت (شکل ۵).

تعیین زمان ماندگاری باکتری Psp روی بذر لوبیا

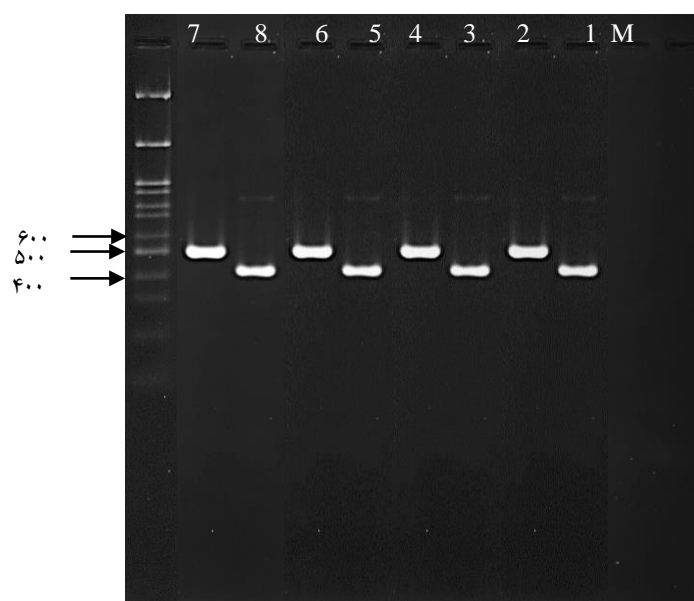
برای تعیین زمان ماندگاری باکتری Psp26 روی بذر لوبیا، عمل خیساندن بذرهاى آلوده در محلول نمکی Salin و سپس کشت سوسپانسیون حاصل روی محیط‌های NA و KB در روزهای صفر، دو، چهار، هشت، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۷۵، ۹۰، ۱۱۰، ۱۲۸ و ۴۲۰ روز در چهار تکرار انجام شد. در همه موارد، از سوسپانسیون‌های تهیه شده، جمعیت زیادی از یک نوع کلنی باکتریایی یکنواخت، دوکی شکل با حاشیه مضرس روی محیط‌ها رشد کرد که در محیط KB و تحت نور UV رنگ آبی فلورسنت داشت. بررسی دو نمونه از این باکتریها در هر مقطع زمانی آزمایش به لحاظ بیماریزایی و واکنش nested-PCR با جفت آغازگرهای نشان داد که این باکتریهای دوکی فلورسنت کننده با جفت آغازگرهای P_{5.1}/P_{3.1} و P_{5.2}/P_{3.2} به ترتیب باندهای حدود ۵۰۲ و ۴۵۰

تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی جدایه های Psp

پس از توالی‌یابی بخشی از ناحیه ژنی *gyrB* جدایه های Psp26 (شماره دسترسی PP973855) و Psp91 (شماره دسترسی PP973556) و همچنین بخشی از ژن *rpoD* جدایه Psp26 (شماره دسترسی PP973857) و Psp91 (شماره دسترسی PP973858)، برای تحلیل روابط تبارزایی این جدایه‌ها با گونه‌های مختلف *Pseudomonas* spp. درخت فیلوژنتیکی به روش maximum-likelihood رسم شد. نتایج بدست آمده از ترسیم درخت فیلوژنی بر مبنای توالی‌های به هم پیوسته *gyrB* و *rpoD* نشان داد که جدایه های Psp26 و Psp91 همراه با جدایه های Psp ثبت شده در NCBI، در یک خوشه (cluster) قرار می‌گیرند. این خوشه در ارتباط نزدیک با خوشه‌های مربوط به نژادهای مختلف گونه های *P. amygdali* pv. *aesculin* (bootstrap ۶۷٪) و *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (bootstrap ۷۶٪) یک کلاد را تشکیل دادند. کلاد مزبور با درجه اعتبار بالاتر از ۹۰٪ از کلاد در برگیرنده نژادهای

بدست آمده از بذرها روند کاهش تدریجی داشت. بطوریکه، در آخرین بازپایی (۱۴ ماه)، کلنی‌های بدست آمده از هر ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون بذر در حد چهار تا نه کلنی بود. به نظر می‌رسد که بقای باکتری روی بذر تا مدت‌های طولانی هم ادامه پیدا کند که با توجه به محدودیت زمانی، ادامه آزمایش در آینده پیگیری خواهد شد.

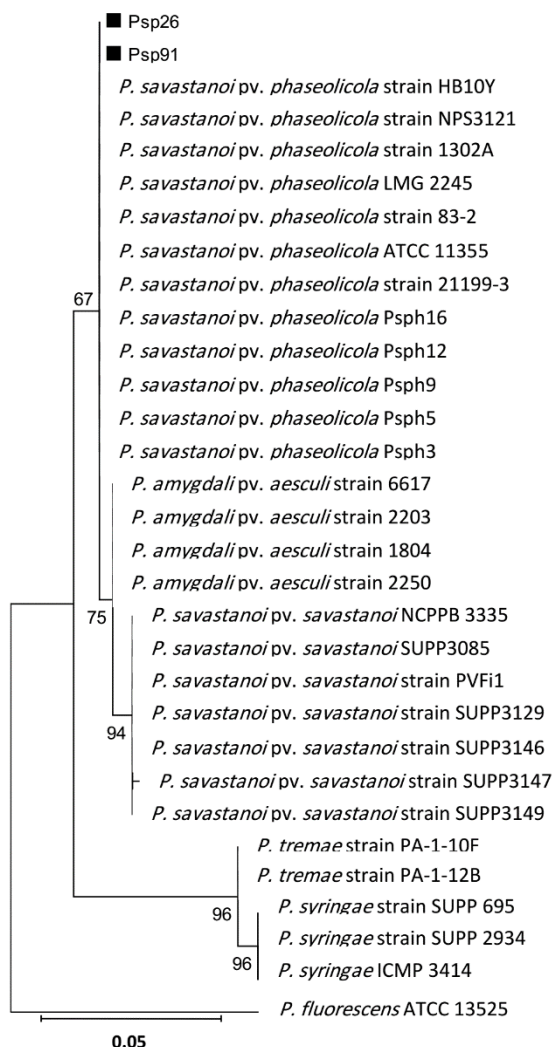
نوکلئوتیدی تولید می‌کنند و قادر به ایجاد علایم آسوخستگی در غلاف لوبیا سبز هستند. این ویژگی‌ها با خصوصیات کلنی‌های جدایه Psp26 که بذرها با آن آلوده شده بودند، مطابقت داشت. گرچه در مراحل زمانی اولیه بازپایی (تا ۱۲۰ روز) جمعیت زیادی از باکتری روی محیط‌کشت رشد کرد، ولی در مراحل بازپایی در ماه‌های بعدی، جمعیت باکتری



شکل ۵- تکنیر بخشی از خوشه ژنی فازنولوتوکسین جدایه‌های *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* طی واکنش nested-PCR با جفت آغازگرهای مرحله اول (P5.1/ P3.1) (502bp) و جفت آغازگرهای مرحله دوم (P5.2/ P3.2) (450bp) M. نشانگر DNA (Ladder plus)، PSSB (چاهک‌های ۱ و ۲)، BHB26 (چاهک‌های ۳ و ۴)، BHB91 (چاهک‌های ۵ و ۶)، BHB78 (چاهک‌های ۷ و ۸)

Fig 5. Partial amplification of the phaseolotoxin gene cluster from isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* using nested-PCR with primer pair P5.1/P3.1 (first round) followed by primer pair P5.2/P3.2 (second round)

M. DNA marker, PssB (1&2), BHB26 (3&4), BHB91 (5&6), BHB78 (7&8)



شکل ۵. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی های بهم پیوسته ژن های خانه دار *gyrB* و *rpoD* دو سویه نماینده *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp26 و Psp91) جدا شده از استان های جنوبی ایران در مقایسه با توالی های بهم پیوسته *gyrB-rpoD* سویه های نزدیک بهم *Pseudomonas* spp. بدست آمده از NCBI. توالی *P. fluorescens* به عنوان خارج از گروه استفاده شد.

Fig 5. Phylogenetic tree based on concatenated *gyrB* and *rpoD* sequences of two representative strains of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp26 and Psp91) isolated from southern provinces of Iran with the *gyrB-rpoD* sequences of closely related strains of *Pseudomonas* spp. retrieved from NCBI database. Sequence of *P. fluorescens* was used as an outgroup.

بحث

اینوسیتول، لاکتوز، اریتريتول و همچنين مانيتول منفي بود، ولي آنها توانستند قندهای گلوکز، سوکروز، آرابینوز و سلوبیوز را مصرف نمایند. این خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها با مشخصات باکتری Psp مطابقت داشت که به عنوان عامل بیماری سوختگی‌هاله‌ای لوبیا گزارش شده است (Schaad et al. 2001, Lelliott et al. 1966).

با وجود این‌که هنوز هم نام قدیمی عامل بیماری سوختگی‌هاله‌ای لوبیا (*P.syringae* pv. *phaseolicola*) در بعضی از منابع علمی مشاهده می‌شود ولی براساس طبقه‌بندی جدید باکتری‌های جنس *Pseudomonas*، پاتوار *P.syringae* pv. *phaseolicola* از گروه *syringae* جدا شده و به گونه *P.savastanoi* منتقل شده است. بنابراین در حال حاضر *P.savastanoi* pv. *phaseolicola* به عنوان عامل بیماری سوختگی‌هاله‌ای لوبیا شناخته می‌شود. طبق این طبقه‌بندی، *P.syringae* به نه گونه ژنتیکی (Genomospecies) گروه‌بندی شده است که در بین آنها *P.syringae* pv. *savastanoi* وجود ندارد؛ بلکه *P.savastanoi* به عنوان گونه‌ای مجزا با پاتوارهای *glycinea savastanoi phaseolicola* و *tabaci* شناخته می‌شود (Gardan et al. 1992, Nobel et al. 2019). بر اساس این طبقه‌بندی، فرض شد که جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش به لحاظ آزمون‌های بیوشیمیایی به گونه Psp نزدیک‌تر هستند و با گونه *P.syringae* تفاوت دارند.

انگشت‌نگاری ژنتیکی جدایه‌های منتخب با آزمون‌های ERIC-PCR و BOX-PCR نشان داد که این جدایه‌ها به لحاظ الگوی تکثیر باندي DNA یکسان هستند و احتمالاً از نظر ژنتیکی مشابه یکدیگر می‌باشند (شکل ۳). این یکنواختی پروفیل انگشت‌نگاری ژنتیکی در آزمون ERIC-PCR و BOX-PCR برای جدایه‌های Psp بدست آمده از گیاه ماش (*Vigna radiata* L.) نیز گزارش شده است. (Nobel et al. 2020). تکثیر یک قطعه DNA حدود

بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی قادرند در بذر گیاهان آلوده باقی مانده و پس از رشد گیاهچه و طی شرایط مساعد، باعث ایجاد بیماری در میزبان خود شوند. سازگاری این عوامل بیمارگر با شرایط اقلیمی و تکثیر آنها در سطح مرطوب اندام‌های هوایی تا سطح آستانه ایجاد بیماری، در بروز خسارت آنها نقش اساسی دارد (Hirano & Upper 1983). طی سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰، علایمی مشابه با بیماری باکتریایی سوختگی‌هاله‌ای لوبیا در سطح سبزی‌فروشی‌های اصفهان مشاهده شد که به شکل لکه‌های آبسوخته روی غلاف‌های لوبیاسبز جلب توجه می‌کرد. علایم بیماری در این لوبیاهای سبز که از مناطق جنوبی کشور مانند شهرهای بندرعباس، میناب، کازرون و جیرفت به بازار اصفهان وارد شده بودند، در ماه‌های اسفند و فروردین به فراوانی قابل ردیابی بود. در ماه‌های دیگر سال و حتی در مزارع لوبیای استان اصفهان (تابستان)، چنین علایمی روی غلاف‌های لوبیاسبز وجود نداشت. از نمونه‌های غلاف‌سبز و نیز برگهای متصل به بعضی از آنها با علایم آبسوختگی‌هاله‌ای، یک نوع کلنی باکتریایی شیرین‌رنگ و دوکی‌شکل با حاشیه مضرس روی محیط NA رشد کرد که توانایی تولید رنگدانه‌های آبی فلورسنت‌کننده، احتمالاً از نوع Pyveredin را روی محیط KB داشت (Owen & Ackerley 2011).

همه ۸۱ جدایه باکتریایی بدست آمده از نظر آزمون‌های ایجاد آبسوختگی در غلاف‌های لوبیا طی ۴۸ ساعت، القا واکنش فوق‌حساسیت روی توتون در کمتر از ۲۴ ساعت و تولید لوان، مثبت بودند؛ ولی نتایج واکنش لماندن سیب‌زمینی، اکسیداز و هیدرولیز نشاسته برای آنها منفی ارزیابی شد. به لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، واکنش این جدایه‌ها برای مصرف اسکولین و کربوهیدراتهای لاکتوز، ملی بیوز، رافینوز، تری‌هالوز، سوکروز، سوربیتول،

همچنین، نتایج درخت فیلوژنتیکی بر مبنای توالی های نوکلئوتیدی ژنهای *gyrB* و *rpoD* نیز تایید نمود که جدایه های بدست آمده در این پژوهش با نژادهای شناخته شده Psp یک خوشه واحد تشکیل می دهند که در مجاورت دو خوشه *P. amygdali* و *P. savastanoi* قرار دارد. از آنجائیکه با مطالعات فیلوژنومیک مشخص شده است که گونه های *P. ficuserectae*, *P. meliae* و *P. savastanoi* مترادف *P. amygdali* می باشند (Gomila et al. 2017)، این رابطه نزدیک جدایه های Psp به گونه *P. amygdali* دور از انتظار نیست.

به دلیل این که جدایه های واجد ژن های فازئولوتوکسین در شرایط محیطی خنک و مرطوب می توانند باعث اپیدمی بیماری سوختگی هاله ای لوبیا در سطح وسیعی بشوند (Aguilera et al. 2017, Mitchell 1978)، خسارت قابل توجه Psp به لوبیاهای سبز در شرایط بارانی ماه های اسفند و فروردین مناطق جنوبی کشور قابل توجیه می باشد. می توان گفت آلودگی اولیه بذره های کاشته شده به Psp فراهم بودن شرایط خنک و مرطوب (Taylor et al. 1979b, Nobel et al. 2019) به کمک بارندگی های فصلی (اسفند تا اردیبهشت سال های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰)، توانسته است بروز اپیدمی بیماری سوختگی هاله ای لوبیا را در مناطق جنوبی کشور تسهیل نماید.

طی این تحقیق معلوم شد که باکتری Psp می تواند به مدت بیش از یکسال بر روی بذر های آلوده باقی بماند. هرچند فرصت کافی برای ادامه آزمایش وجود نداشت، ولی ماندگاری بیش از یکسال باکتری روی بذر های آلوده در این تحقیق می تواند فرضیه بقای طولانی مدت Psp روی بذر (Schwartz et al. 2005) را تقویت کند. در صورت قبول این فرضیه و تایید مشاهدات مبنی بر اپیدمی شدن بیماری بلایت هاله ای لوبیا در منطق جنوبی کشور طی ماه های توام با بارندگی (ماه های اسفند و فروردین ۱۳۹۸-۱۴۰۰)، می توان گفت که در صورت استفاده از

۱۵۰۰ نوکلئوتیدی در جدایه های منتخب با جفت آغازگر عمومی ناحیه 16S rDNA پروکاریوت ها (27F/1492R) و توالی یابی بخشی از DNA تکثیر شده در جدایه شاخص Psp26 مشخص نمود که این باکتری در حد ۹۹/۹٪ به جدایه های جنس *Pseudomonas* در بانک ژن جهانی (BLAST) شبیه است. این شناسایی جنس جدایه ها با تکثیر قطعات مورد انتظار DNA در واکنش های PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی توصیه شده برای *Pseudomonas* sp. شامل جفت آغازگرهای PA-GS- F/PA-GS-R (۶۱۸bp) و PS-F/PS-R (۱۰۱۸ bp) تایید شد.

در آزمون nested-PCR جدایه ها با جفت آغازگرهای شناسایی کننده ژن های فازئولوتوکسین، تولید باندهای مورد انتظار حدود ۵۰۲bp با جفت آغازگر P_{5.1}/P_{3.1} (مرحله اول) و ۴۵۰bp با جفت آغازگر P_{5.2}/P_{3.2} (مرحله دوم) معلوم نمود که این جدایه ها به پاتووار *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* تعلق دارند. توالی یابی قطعه حدود ۵۰۲bp در مرحله اول nested-PCR نشان داد که توالی محصول PCR این جدایه ها با دو باکتری *P. savastanoi* pv. *actinidia* و *phaseolicola* شباهت ۱۰۰٪ دارد. با توجه به این که کیوی به عنوان میزبان انحصاری *P. savastanoi* pv. *actinidia* گزارش شده است (Sawada & Fujikawa 2019)، بنابراین تشخیص جدایه های لوبیای مورد آزمایش به عنوان *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* منطقی به نظر می رسد. از آنجایی که جدایه های تولیدکننده فازئولوتوکسین قادر به مصرف قند مانیتول نیستند (Rico et al. 2003, Marques et al. 2000) ولی جدایه های فاقد ژن تولید کننده این توکسین توانایی استفاده از مانیتول را دارند (Rico, et al. 2003)، بنابراین می توان جدایه های این پژوهش را به لحاظ عدم استفاده از مانیتول به عنوان منبع کربن، جدایه های Psp تولیدکننده فازئولوتوکسین در نظر گرفت.

بذرهای آلوده به Psp، در سال‌های آینده نیز اپیدمی شدن بیماری بلایت هاله ای لوبیا در ماه‌های معتدل و پربارش مناطق جنوبی کشور، دور از انتظار نیست. به این لحاظ، تلاش برای دستیابی به روش‌های دقیق، سریع و کم هزینه برای پایش بذرهای مورد کاشت زارعین در جهت اعمال قرنطینه خارجی و داخلی برای پیشگیری از انتشار عامل بیماری می‌تواند در کاهش گسترش بیماری لکه هاله ای لوبیا به مناطق جدید کمک نماید.

References

منابع

- Aguilera S., Morales A. A., Murillo J. Flores J. L. H., Bravo J. and Zavala S. D. T. 2017. Temperature-mediated biosynthesis of the phytotoxin phaseolotoxin by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* depends on the autoregulated expression of the *phtABS* genes. *PLoS One* 12: e0178441. doi:10.1371/journal.pone.0178441
- Arnold D. L., Lovell H. C., Jackson R. W. and Mansfield J. W. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from has been to supermodel. *Molecular. Plant Pathol.*12: 617-627. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x
- Bardaji L., Prez-Martinez I., Rodriguez-Moreno L., Rodriguez-Palenzuela P., Sundin G. W. and Murillo J. 2011. Sequence and role in virulence of the three plasmid complement of the model tumor-inducing bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *PLoS One*. 6: e25705.
- Dell'Olmo E., Tiberini A., Sigillo L. 2023. Leguminous Seedborne Pathogens: Seed Health and Sustainable Crop Management. *Plants* 12, 2040. <https://doi.org/10.3390/plants1210>
- Ferguson A. R. and Johnston J. S. 1980. Phaseolotoxin-chlorosis, ornithine accumulation and inhibition of ornithine carbamoyltransferase in different plants. *Physiological Plant Pathology* 16:269-75. doi:10.1016/0048-4059(80)90041-7
- Frank J. A., Reich C.I., Sharma S., Weisbaum J. S., Wilson B. A. and Olsen G. J. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*74: 2461-2470.
- Garibaldi J. A. 1967. Media for the enhancement of fluorescent pigment production by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 94: 1296-1299.
- Gardan L., Bollet C., Abu Ghorrah M., Grimont F. and Grimont P. A. D. 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 606-612. doi:10.1099/00207713-42-4-606.
- Gomila M., Busquets A., Mulet M., García-Valdés E. and Lalucat J. 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*. 8:2422. doi: 10.3389/fmicb.2017.02422
- Hirano S. S. and Upper C. D. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 21: 243-270.
- 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.
- Marques A.S.d.A., Corbière R., Gardan L., Toute C., Manceau C., Taylor J. D. and Samson, R. 2000. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 715-734. doi:10.1023/A:1026563831461.
- Mitchell, R. E. 1978. Halo blight of beans: toxin production by several *Pseudomonas phaseolicola* isolates. *Physiological Plant Pathology* 13: 37-49.
- Mulet M., Bannasar A., Lalucat J. and Garcia-Valdes E. 2009. An rpoD based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* 23:140-147.
- Murray M. G. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic*

- Acids Research. 8: 4321-4325.
- Nobel T. J., Young A. J., Douglas C., Williams B. and Mundree S. 2019. Diagnosis and management of halo blight in Australian mung beans. *Crop Pasture Science* 70: 195–203.
- Nobel T. J., Young A. J., Kelly L. A., Barrerro R. A., Douglas C. A., Long H., Williams B. and Mundree, S. 2020. Characterisation of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* population found in Eastern Australia associated with halo blight disease in *Vigna radiata*. *Australasian Plant Pathology* 49: 515-524. doi:10.1007/s13313-020-00722-8.
- Oguiza J. A., Rico A., Rivas L.A., Sutra L., Vivian A. and Murillo. J. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. *Microbiology* 150: 473-482.
- Owen J. G. and Ackerley D. F. 2011. Characterization of pyoverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a. *BMC Microbiology* 11: 218. doi:10.1186/1471-2180-11-218.
- Prosen D., Hatziloukas E., Schaad N. W. and Panopoulos N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83: 965-970.
- Rico A., Lopez R., Asensio C., Aizpun M., Asensio S., Manzanera C. and Murill J. 2003. Nontoxigenic strains of *P. syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology* 93: 1553-1559.
- Sawada H. and Fujikawa T. 2019. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, pathogen of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology* 68:1235–1248.
- Schwartz H., Steadman J., Hall R. and Forster R. 2005. Compendium of bean diseases. 2nd Ed. American Phytopathological Society Press. Minnesota, USA.
- Spilker T., Coenye T., Vandamme P. and Li Puma J. J. 2004. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2074- 2079.
- Taylor J. D., Dudley C. L. and Presly L. 1979a. Studies of halo blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Annals of Applied Biology* 93: 267–277. doi:10.1111/j.1744-7348.1979.tb06541.x
- Taylor J. D., Phelps K., and Dudley C. L. 1979b. Epidemiology and strategy for the control of halo-blight of beans. *Annals of Applied Biology* 93: 167–172. doi:10.1111/j.1744-7348.1979.tb06527.x
- Turner, J. G. 1986. Effect of phaseolotoxin on the synthesis of Arginine and protein. *Plant Physiology* 86: 760-765.
- Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P. M., Watrud L. S. and Di Giovanni G. D. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2545-2553.
- Versalovic J., Schneider G. M., De Bruijn F. and Lupski J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
- Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A. and Harayama S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394.
- Young J. M. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*:92: S 1.5–S1.14.