

مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و دامنه میزبانی استرین‌های ایرانی *Pseudomonas savastanoi*، عامل گال در زیتون و خرزهره

گلچهر پورمحمدی^۱، علی علیزاده علی‌آبادی^{۲*}، نرگس فلاحی چرخایی^{۳*} و ابوالقاسم قاسمی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیک: aalizadeh1340@yahoo.com

۳- نویسنده مسئول، استادیار، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران پست الکترونیک: falahicharkhabi@ut.ac.ir

۴- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

چکیده

برای مطالعه خصوصیات فنوتیپی، مولکولی، بیماری‌زایی و فیلوژنتیکی عوامل باکتریایی گال‌های زیتون و خرزهره، نمونه‌هایی از برگ، دمبرگ، شاخه و تنه این درختان که دارای علائم گره یا گال بودند، از شهرستان‌های مختلف استان‌های مازندران، گیلان و قزوین جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. از محیط کشت King's B برای جداسازی استفاده شد و ۱۸۰ استرین از گال‌های خرزهره و ۱۵ استرین از گال‌های زیتون خالص‌سازی شدند. آزمون بیماری‌زایی استرین‌های جدا شده از گال زیتون و گال خرزهره نشان داد، ۱۴ استرین جدا شده از زیتون و ۱۸ استرین جدا شده از خرزهره روی میزبان اصلی خود بیماری‌زا بودند. به علاوه استرین‌های خرزهره روی شاخه‌های جوان زیتون نیز بیماری‌زا هستند، در صورتی‌که استرین‌های زیتون روی خرزهره بیماری‌زا نبودند. تمامی استرین‌ها گرم منفی، کاتالاز مثبت و هوازی اجباری بودند و توانایی تولید رنگدانه فلورسنت را روی محیط کشت King's B داشتند. در آزمون‌های LOPAT، تولید لوان، آنزیم اکسیداز، آنزیم آرژنین‌دی‌هیدرولاز و پوسیدگی سیب‌زمینی منفی و تنها در آزمون فوق‌حساسیت در توتون و شمعدانی مثبت بودند. واکنش پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی عوامل گال زیتون (PsvF/PsvR) و خرزهره (PsnF/PsnR) روی استرین‌های دارای توانایی ایجاد فوق‌حساسیت در توتون انجام شد و به ترتیب در ۱۴ استرین از نمونه‌های گال زیتون و ۱۸ استرین از نمونه‌های گال خرزهره قطعه مورد نظر به اندازه ۳۸۸ و ۳۴۹ جفت‌باز تکثیر شد. استرین‌ها براساس ویژگی‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی به ترتیب *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* و *P. savastanoi* pv. *nerii* شناسایی شدند. برای تعیین دقیق جایگاه تاکسونومیک استرین‌ها از روش تجزیه و تحلیل توالی چند ژنگاهی (MLSA) با تکثیر و توالی‌یابی قطعه‌ای از سه ژن خانه‌دار *rpoD*، *gyrB* و *spoB* استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی براساس بیشینه تشابه (Maximum likelihood) توالی سلسه‌ای با ۱۰۰۰ بار تکرار (bootstrap) ترسیم شد. استرین‌های مورد مطالعه بدون تمایز و تفکیک در یک گروه در کنار استرین‌های پاتوتیپ قرار گرفتند. هرچند درخت‌های فیلوژنی مبتنی بر توالی ژن‌های *rpoB* و *gyrB* نتوانست استرین‌های Psv و Psn را از هم تفکیک کند، البته درخت فیلوژنی رسم‌شده براساس ژن *rpoD* استرین‌های Psv و Psn را از هم تفکیک کرد.

واژه‌های کلیدی: ایران، آنالیز چند ژنگاهی (MLSA)، آزمون LOPAT، *Pseudomonas*

مقدمه

زیتون *Olea europaeae* L. از تیره زیتونیان (*Oleaceae*) با دو زیرگونه *sativa* و *oleaster* (به ترتیب فرم اهلی و وحشی زیتون) است (Carriero et al., 2002). درخت زیتون از نظر اقتصادی و کشاورزی، زیست‌محیطی و سلامت انسان مهم و ارزشمند است (Conde et al., 2008). این درخت به دلیل مقاومت در برابر خشکی و شوری خاک (Moula et al., 2020)، جلوگیری از فرسایش خاک (Keesstra et al., 2018)، تولید روغن و میوه با اثر درمانی، بهداشتی و خوراکی از اهمیت بالایی برخوردار است. هم‌اکنون، زیتون در ۲۶ استان کشور کشت می‌شود. بیشترین میزان تولید میوه زیتون در استان‌های زنجان، گیلان، قزوین، فارس و گلستان است. سطح زیرکشت زیتون در ایران در سال ۱۳۹۹ بیش از نه هزار هکتار و میزان تولید زیتون حدود ۱۸ هزار تن با عملکرد متوسط پنج تن در هکتار بوده است (Anonymous, 2021).

خرزهره (*Nerium oleander*) از تیره خرزهره (*Apocynaceae*)، درختچه‌ای است زینتی و پرشاخه که در جنوب اروپا، شمال آفریقا، به‌ویژه الجزیره و تونس (در کنار رودخانه‌ها) و همچنین در آسیا و ایران می‌روید.

بیمارگر *Pseudomonas savastanoi* متعلق به فیلوگروپ ۳ (PG3) از گروه *P. syringae* است. این تنها فیلوگروپی است که شامل باکتری‌هایی است که باعث رشد بیش از حد و تومور (گره) در میزبان‌های چوبی می‌شود (Lamichhane et al., 2017; Caballo-Ponce et al., 2014). آلودگی‌های مصنوعی با استرین‌های *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (*Psv*)، *P. savastanoi* pv. *nerii* (*Psn*) و *P. savastanoi* pv. *fraxini* (*Psf*) باعث ایجاد گال در گیاهان میزبان می‌شوند. استرین‌های *Psf* باعث ایجاد شانکر همراه با ترشحات زگیل‌مانند در زبان‌گنجشک و زیتون می‌شوند (Janse, 1981; Gardan et al., 1992; Caballo-Ponce et al., 2017). استرین‌های *Psv* باعث ایجاد گال در زیتون و زبان‌گنجشک می‌شود اما در خرزهره باعث ایجاد گال نمی‌گردد، درحالی‌که استرین‌های *Psn* می‌توانند هر سه میزبان (زیتون، خرزهره و

زبان‌گنجشک) را آلوده کنند. در مقابل، دامنه میزبان استرین‌های *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (*Psr*) به جاروی اسپانیایی محدود می‌شود (Janse, 1982; Iacobellis et al., 1998; Ramos et al., 2012).

گال باکتریایی زیتون یکی از جدی‌ترین بیماری‌های درختان زیتون در بیشتر مناطق زیتون‌کاری در سراسر جهان و بیشتر در کشورهای مدیترانه‌ای است. این بیماری می‌تواند به آسیب‌های شدید در باغ‌های زیتون منجر شود و زیان‌های جدی از نظر تولید بوجود بیاورد (Iacobellis, 2001). باکتریایی بودن آن توسط Savastano از سال ۱۸۸۷ شناخته شده است (Smith & Rorer, 1904). باکتری عامل گال زیتون و خرزهره باعث افزایش تعداد سلول‌های میزبان در محل آلودگی و ایجاد گال‌های کروی روی تنه و شاخه‌ها و کمتر روی برگ‌ها و میوه‌ها می‌شود (Sisto & Smith, 1920; Iacobellis, 1999). آلودگی به باکتری عامل گال زیتون در زخم‌های تازه درختان زیتون با یک حفره کوچک ناشی از فروپاشی سلول‌های گیاهی مجاور محل آلودگی شروع می‌شود. سپس، سلول‌های بافت حاشیه حفره تکثیر و ایجاد گال می‌کنند (Smith, 1920; Surico, 1977). توسعه گال وابسته به تولید فیتوهورمون‌های باکتریایی اسیداین‌دول‌استیک و سیتوکینین است (Caballo-Ponce et al., 2017; Rodríguez-Moreno et al., 2008). گیاهان زیتون با آلودگی متوسط (نیم تا یک گال در هر ۳۰ سانتی‌متر ساقه) میوه‌های کمتر و ۲۸ درصد تولید کمتری نسبت به گیاهان کمتر آلوده (یک‌دهم تا سه‌دهم گال گره در هر ۳۰ سانتی‌متر ساقه) دارند (Salman et al., 2020). به‌علاوه، تفاوت معنی‌داری در وزن میوه‌های زیتون در هر درخت زیتون با آلودگی شدید و خفیف وجود دارد (Schroth et al., 1968a). خسارت‌های اقتصادی ناشی از این بیماری، علاوه بر کاهش تولید، شامل محدودتر و پرهزینه‌تر شدن تجارت صادرات نهال و قلمه از کشورهای آلوده به کشورهای دیگر نیز می‌شود. بیماری گال باکتریایی زیتون در فهرست عوامل قرنطینه خارجی ایران و برخی از کشورهای دیگر از جمله شیلی و مکزیک قرار دارد

دوباره با آب مقطر سترون شسته شد. قطعاتی از نواحی دارای علائم در داخل ظروف پتری در چند قطره آب مقطر سترون خرد و یکنواخت شد. بعد از ۳۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون حاصل به کمک لوپ پلاتینی سترون در محیط کشت King's B، به صورت مخطط کشت شد. تشک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سه روز پس از کشت، تک‌پرگنه‌های ظاهر شده را انتخاب و برای اطمینان از خلوص، دوباره روی آگار غذایی مخطط شد. از هر تشک پتری یک پرگنه انتخاب و در پتری حاوی آگار غذایی تکثیر گردید (Schaad et al., 2001). نمونه‌ها برای استفاده در پنج درجه سلسیوس و برای نگهداری طولانی مدت در گلیسرول ۱۵ درصد در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی استرین‌های دارای توانایی ایجاد فوق‌حساسیت روی توتون ارزیابی شد. استرین‌ها روی محیط کشت آگار غذایی (NA) و در دمای ۲۳ درجه سلسیوس کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت، با سرنگ سترون مقداری از پرگنه هر یک از استرین‌ها برداشته شده و با ایجاد زخم در ساقه جوان زیتون رقم زرد و خرزهره مایه‌زنی شد، آنگاه ساقه گیاه آغشته به باکتری و محل مایه‌زنی با پارافیلیم پوشیده شد. گیاهان مایه‌زنی شده به مدت پنج هفته در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۵ درصد نگهداری شدند. از آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Marchi et al., 2005; Janse, 1982).

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

ویژگی‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تمامی استرین‌های بیماری‌زا بررسی شد. آزمون گرم با حلالیت در پتاس (KOH) سه درصد به روش Suslow و همکاران (۱۹۸۲) و آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش Hugh

(Taghavi & Ghasemi, 2010).

پاتووارهای Psv و Psn به ترتیب به عنوان عامل بیماری گال زیتون و خرزهره در ایران در سال ۱۳۸۳ در زیتون شناسایی شده است (Ghasemi et al., 2006). سپس پاتووار Psv در سال ۱۳۹۴ به صورت گال‌هایی روی تنه و شاخه‌های تعدادی از درختان زیتون چهارساله در باغی در استان گلستان مشاهده شد (Khezri et al., 2019). این بیماری از گیاه یاسمن زمستانی (*Jasminum nudiflorum*) در شیراز (Taghavi & Hasani, 2012) و پاتووار Psn از خرزهره از شهرهای غرب مازندران، تهران و لوشان رودبار گزارش شده است (Taghavi & Ghasemi, 2010). بیماری گال باکتریایی از درختان زیتون تلخ از فضای سبز شهر شیراز گزارش شده است، اما عامل آن برخلاف بقیه گال‌ها، گونه *P. meliae*، شناسایی شده است (Taghavi & Ghasemi, 2010).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی و تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، ژنتیکی و بیماری‌زایی پاتووارهای Psv، عامل گال زیتون و Psn، عامل گال خرزهره و نیز کارایی آنالیز توالی‌های چند ژنگاه در تفکیک پاتووارهای Psv و Psn است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در ماه‌های تیر و مرداد ۱۴۰۰، نمونه‌های دارای علائم گال روی سرشاخه‌های زیتون از لوشان در استان گیلان و باغ صبا در استان قزوین و نیز نمونه‌های خرزهره که دارای علائم گال روی برگ و سرشاخه‌های جوان بودند، از نواحی ساحلی مازندران (سرخ‌رود، محمودآباد، رویان، نور، چالوس و نوشهر) جمع‌آوری شد. نمونه‌های آلوده، برای جداسازی عامل بیماری و بررسی‌های بعدی داخل پاکت‌های کاغذی، به آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور منتقل گردید.

جداسازی و نگهداری استرین‌ها

برگ‌ها و سرشاخه‌های آلوده، ابتدا زیر جریان آب و بعد

آزمون‌های فنوتیپی از استرین *Pseudomonas syringae* 1241 به‌عنوان شاهد استفاده گردید.

شناسایی مولکولی استرین‌ها

استخراج DNA ژنومی به روش لیز قلیایی انجام شد. باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی محیط NA تکثیر شدند و سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^7 سلول در میلی‌لیتر از هر باکتری در آب مقطر تهیه و ۱۰ میکرولیتر KOH پنج درصد به آن اضافه شد. سپس به مدت ده دقیقه در حمام آبی ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت، نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. دو میکرولیتر از محلول رویی برای انجام واکنش زنجیری پلیمرز استفاده شد (Rademaker *et al.*, 1997). از دو جفت آغازگر اختصاصی برای شناسایی پاتووار *P. savastanoi* pv. *nerii* و *P. savastanoi* pv. *savastanoi* استفاده گردید (Tegli *et al.*, 2010) (جدول ۱).

Leifson (۱۹۵۳) انجام شد. آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره‌ای از باکتری روی کاغذ صافی آغشته به محلول یک‌درصد تترامتیل‌پارافنیل‌دی‌آمین دی‌هیدروکلراید انجام گردید (Kovacs, 1956). آزمون فوق‌حساسیت در توتون و شمعدانی به روش Klement و همکاران (۱۹۶۴) انجام شد. آزمون‌های تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B و رنگدانه صورتی روی محیط YDC به روش Schaad و همکاران (۲۰۰۱)، آزمون‌های آرژنین‌دی‌هیدرولاز به روش Thornely (۱۹۶۰)، واکنش فوق‌حساسیت روی توتون Cowan (Lelliott *et al.*, 1966) و هیدرولیز نشاسته به روش (۱۹۷۴) انجام شد. آزمون‌های اوره‌آز، تولید H₂S از سیستین، تولید اندول، تولید لوان، رشد در نمک طعام (NaCl) سه درصد، هیدرولیز اسکولین به روش Schaad و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. در آزمون توانایی استفاده از اسیدهای آلی و تولید اسید از قند از محیط پایه Ayers (۱۹۱۹) و غلظت ۰/۲۵ درصد قند یا اسید آلی مورد نظر استفاده شد (Schaad *et al.*, 2001).

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده در این مطالعه

Table 1. Primer used in this study

پاتووار/ژن هدف Pathovar/target gene	نام آغازگر Primer name	توالی (۵'-۳') Sequence (5'-3')	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)	اندازه قطعه (bp) Amplicon size (bp)	منبع Reference
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	PsvF PsvR	GGCGATGTCTCAGCGGATTTG GATCAAGTGTCGAAGGAAGTGAAGG	55	388	Tegli <i>et al.</i> , 2010
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	PsnF PsnR	ACCCCTCATTGTAACGGATG TCCCCGGAATCAACACTTA	57	349	Tegli <i>et al.</i> , 2010
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -LAPS <i>rpoB</i> -LAPS27	TGGCCGAGAACCAGTTCGCGCT CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG	58	1247	Tayeb <i>et al.</i> , 2005
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -Fps <i>gyrB</i> -Rps	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAYTC TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	63	650	Sarkar & Guttman, 2004
<i>rpoD</i>	<i>rpoD</i> -Fps <i>rpoD</i> -Rps	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG	67	550	Sarkar & Guttman, 2004

توالی‌یابی به شرکت پیشگام ارسال شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با استفاده از ابزار ClusalW در نرم‌افزار BioEdit 7. 25 (Hall, 1999) با توالی‌های ناحیه مشابه ثبت‌شده در پایگاه NCBI انجام شد. با استفاده از ابزار Editseq از مجموعه نرم‌افزار DNASTAR Inc., Madison, WI) DNASTAR در ترجمه آمینواسید اطمینان حاصل شد. با تجمیع توالی ژن‌های *rpoB*، *rpoD*، *gyrB* با دیگر توالی‌های موجود در بانک ژن (GeneBank) مقایسه شد. دندروگرام‌های مقایسه‌ای با روش‌های Character از روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum likelihood) با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X (Kumar et al., 2018) به صورت چندژنی، همچنین توالی‌های هر یک از نواحی به‌طور جداگانه ترسیم شد. مدل جایگزینی (Substitution model) برای ترسیم دندروگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X (Kumar et al., 2018) و بر پایه پایین‌ترین عدد (Bayesian Information Criterion) BIC انتخاب شد. تمامی مدل‌های بررسی با ۱۰۰۰ بار تکرار نمونه‌برداری (Bootstrap) انجام شد.

نتایج

نمونه‌برداری و علائم‌شناختی

در بازدیدهای انجام‌شده در ماه‌های تیر و مرداد ۱۴۰۰، از مناطق مختلف ساحلی مازندران (سرخ‌رود، محمودآباد، رویان، نور، چالوس و نوشهر) برای خرزهره علائم بیماری با شدت‌های مختلف مشاهده شد، این علائم شامل توده‌های متورمی (گال‌هایی) روی قسمت‌های مختلف گیاهان از جمله دم‌برگ، سرشاخه، شاخه، تنه و پهنک برگ در اندازه‌های مختلف از چند میلی‌متر تا دو سانتی‌متر بود. روی شاخه‌های زیتون هم گال‌های اسفنجی، سخت و قهوه‌ای‌رنگ مشاهده شد. این گال‌ها دارای ظاهری اسفنجی، نامنظم، سخت و قهوه‌ای بودند (شکل ۱). برخی از گال‌های جوان که در مراحل ابتدایی آلودگی بودند، دارای بافت‌های نامتقارن و سبزرنگ بودند. ریزش برگ‌ها، خشکیدن شاخه‌ها و ضعف عمومی گیاهان در درختان آلوده به این بیماری نسبت به درختان سالم بیشتر بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، مسترمیکس 2x Master mix RED (Ampliqon, Denmark) و دو میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf, Germany) انجام گردید. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۵ (PsvF-R) و ۵۷ (PsnF/R) درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه انجام و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد.

تکثیر بخشی از ژن‌های حفظ‌شده RNA پلیمرز زیرواحد بتا (*rpoB*)، RNA پلیمرز زیرواحد دلتا (*rpoD*) و جیراز زیرواحد بتا (*gyrB*) با استفاده از این برنامه دمایی انجام شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه انجام گردید. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۸ تا ۶۷ درجه سلسیوس (جدول ۱)، به مدت یک دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه انجام و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد.

فراورده PCR در ژل آگارز یک‌درصد با بافر TAE 1X در دستگاه الکتروفورز افقی، الکتروفورز شد. پنج میکرولیتر از محصولات PCR با یک میکرولیتر 6x Loading Dye مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ریخته شد. الکتروفورز در ۸۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. پس از پایان الکتروفورز ژل در دستگاه Gel Doc. Lourmat T-5×20- مشاهده و عکس‌برداری شد.

آنالیزهای فیلوژنی

قطعات تکثیرشده از ژن‌های *rpoB*، *rpoD*، *gyrB* برای



شکل ۱- علائم بیماری گال باکتریایی زیتون (A و B) و خرزهره (C و E) جمع‌آوری شده از استان‌های قزوین و مازندران

Figure 1. Typical galls induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on naturally infected olive trees (A, B) and those caused by *P. savastanoi* pv. *nerii* on infected oleander (C-E) collected from Ghazvin and Mazandaran, respectively

جدول ۲- مشخصات استرین‌های بیماری‌زای *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) و *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) جدا شده به ترتیب از گال باکتریایی در زیتون و خرزهره

Table 2. Characteristics of pathogenic strains of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) and *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) isolated from bacterial gall of olive and oleander, respectively.

کد استرین Strain code	میزبان Host	مکان نمونه‌برداری Origin	زمان نمونه‌برداری Isolation date	بیماری‌زایی روی زیتون Pathogenicity on olive	بیماری‌زایی روی خرزهره Pathogenicity on oleander
Psv1, Psv2, Psv3, Psv4, Psv5, Psv6, Psv7	زیتون Olive	قزوین - قزوین Ghazvin-Ghazvin	اردیبهشت ۱۴۰۰ May 2021	+	-
Psv8, Psv9, Psv10, Psv11, Psv12, Psv13, Psv15	زیتون Olive	گیلان - لوشان Guilan- Loshan	اردیبهشت ۱۴۰۰ May 2021	+	-
Psn15, Psn16, Psn17	خرزهره Oleander	مازندران - نور Mazandaran-Noor	خرداد ۱۴۰۰ June 2021	+	+
Psn18, Psn19, Psn20	خرزهره Oleander	مازندران - نوشهر Mazandaran-Noshahr	خرداد ۱۴۰۰ June 2021	+	+
Psn21, Psn22, Psn23	خرزهره Oleander	مازندران - رویان Mazandaran-Rooyan	خرداد ۱۴۰۰ June 2021	+	+
Psn24, Psn25	خرزهره Oleander	مازندران - سرخرود Mazandaran-Sorkhroud	تیر ۱۴۰۰ July 2021	+	+
PsnD, PsnE, PsnH	خرزهره Oleander	مازندران - چالوس Mazandaran- Chaloos	تیر ۱۴۰۰ July 2021	+	+
.PsnM .PsnL .PsnF .PsnG PsnO .PsnN	خرزهره Oleander	مازندران - محمودآباد Mazandaran-Mahmood-Abad	تیر ۱۴۰۰ July 2021	+	+

جداسازی بیمارگر

روی زیتون و ۱۸ استرین جداشده از خرزهره روی خرزهره بیماری‌زا بودند (شکل ۲ و ۳ و جدول ۲). پس از گذشت یک ماه از مایه‌زنی استرین‌های جداشده از زیتون، تنها در شاخه‌های جوان و غیرچوبی زیتون گال ایجاد کردند ولی این استرین‌ها هیچ علامت یا گالی روی گیاه خرزهره ایجاد نکردند. در صورتی‌که همه استرین‌های جداشده از خرزهره روی زیتون هم بیماری‌زا بودند. اندازه گال‌های حاصل از مایه‌زنی چهار استرین جداشده از خرزهره شامل استرین‌های PsnD، PsnE، PsnF و PsnH به مراتب بزرگ‌تر از گال حاصل از مایه‌زنی خرزهره با سایر استرین‌ها بود.

سه روز پس از کشت سوسپانسیون باکتری ۱۵ استرین از نمونه‌های گال زیتون و ۱۸۰ استرین از نمونه‌های گال خرزهره با رنگدانه سبز فلورسانت روی محیط کشت King's B خالص‌سازی شد. پرگنه‌هایی به رنگ سفید مایل به کرم و دارای حاشیه کامل و سطح صاف و براق ظاهر شدند.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی ۱۵ و ۲۸ استرین به ترتیب جداشده از زیتون و خرزهره دارای توانایی ایجاد فوق‌حساسیت در توتون نشان داد، به ترتیب ۱۴ استرین جداشده از زیتون



شکل ۲- آزمون بیماری‌زایی *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* روی زیتون رقم زرد پس از پنج هفته در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۷ درجه سلسیوس (A) کنترل منفی، (B) استرین Psv5، (C) استرین Psv15، (D) استرین Psv8، (E) استرین Psv6، (F) استرین Psv10.

Figure 2. Pathogenicity assays of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from olive on the olive seedlings cv. Zard five weeks after incubation in greenhouse with 20-27°C. (A) Negative control infiltrated using sterile deionized water; seedlings inoculated using strains Psv5 (B), Psv15 (C), Psv8 (D), Psv6 (E), and Psv10 (F).



شکل ۳- آزمون بیماری‌زایی استرین‌های *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* روی خرزهره پس از پنج هفته در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۷ درجه سلسیوس (A) کنترل منفی، (B) استرین PsnH، (C) استرین PsnD، (D) استرین PsnE، (E) استرین PsnF، (F) استرین PsnO.

Figure 3. Pathogenicity assays of *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* strains isolated from Oleander on the oleander seedlings five weeks after incubation in greenhouse with 20-27°C. (A) Negative control infiltrated using sterile deionized water, seedlings inoculated using strains PsnH (B), PsnD (C), PsnE (D), PsnF (E), and PsnO (F).

دی‌ال‌هوموسرین، بنزوات و گلوتامات بودند، اما در استفاده از سوربیتول (هیچ‌یک از استرین‌ها قادر به استفاده از مانیتول، اینوزیتول، ملی‌بیوز، آرابینوز، زایلوز، دی‌ال‌گلیسرات، ال تارترات، سترات، بتائین، گلو تاریک اسید و پی هیدروکسی بنزوات) به‌عنوان منابع کربنی و نیتروژنی نبودند.

شناسایی مولکولی استرین‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

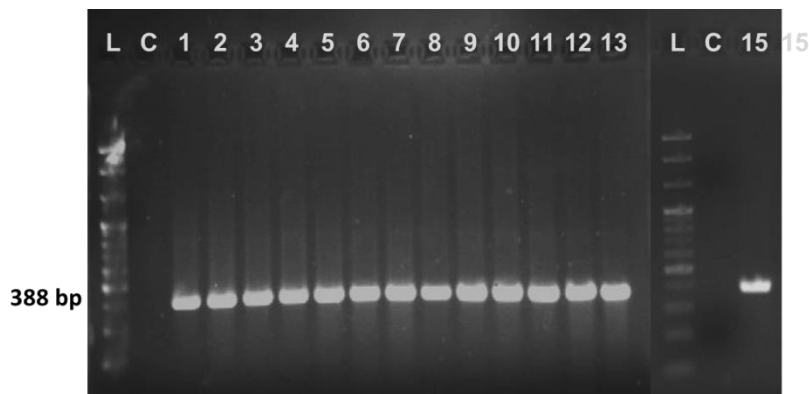
نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از استرین‌های جدا شده از زیتون با جفت آغازگرهای Psv نشان داد، این آغازگرها توانستند در ۱۴ استرین گال زیتون قطعه قابل انتظار ۳۸۸ جفت‌بازی را تکثیر کنند (شکل ۴) و جفت آغازگرهای Psn نیز در ۱۸ استرین بیماری‌زا روی خرزهره قادر به تکثیر قطعه قابل انتظار ۳۴۹ جفت‌بازی بودند (شکل ۵). جفت آغازگرهای Psn توانست قطعه قابل انتظار ۳۸۸

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

مطالعات فنوتیپی روی ۳۲ جدایه بیماری‌زا انجام شد. همه استرین‌ها پس از ۲۴-۴۸ ساعت روی برگ‌های توتون (*Nicotiana glutinosa*) فوق حساسیت ایجاد کردند. تمام استرین‌ها هوازی اجباری بودند و در محیط King's B رنگدانه سبز فلورسنت تولید کردند. استرین‌ها در آزمون‌های تولید لوان مثبت و اکسیداز، آرژنین‌دی‌هیدرولاز و آزمون لهیدگی سیب‌زمینی منفی بودند. همچنین استرین‌ها قادر به هیدرولیز نشاسته، تحمل نمک طعام سه درصد، هیدرولیز کازئین، اسکولین، توئین ۸۰، تولید H₂S از سیستئین، اندول، ذوب ژلاتین و تولید مواد احیاکننده از سوکروز نبودند. همه استرین‌ها در آزمون‌های کاتالاز، تیروزیناز، پروتئاز، اوره‌آز، احیای نترات (فقط استرین‌های Psv) و رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مثبت بودند. استرین‌ها قادر به استفاده از اریتریتول، سلوبیوز، آدونیتول، دی‌تره‌الوز، لاکتات،

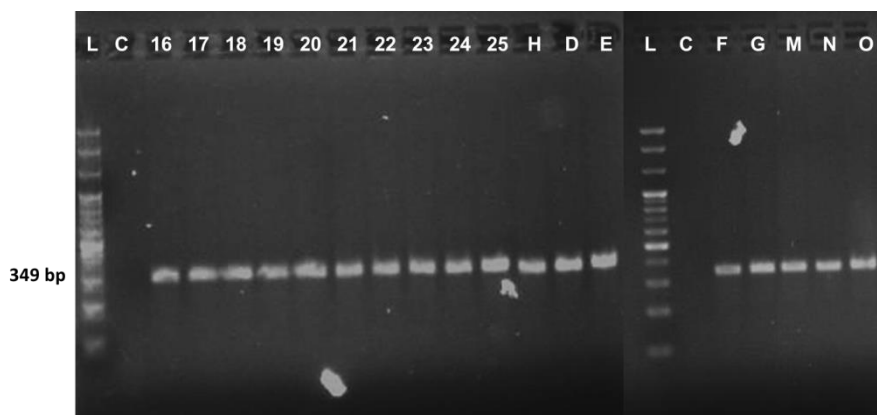
انتظار ۳۴۹ جفت‌بازی را در هیچ‌یک از استرین‌های جداشده از گال خرزهره تکثیر نماید.

جفت‌بازی را در هیچ‌یک از استرین‌های عامل گال زیتون تکثیر کند و جفت آغازگرهای Psv نیز نتوانست قطعه قابل



شکل ۴- ردیابی ۱۴ استرین *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (PsnF/PsnR) روی ژل یک درصد. L: استاندارد جرم مولکولی (100 bp DNA Ladder Ready to Load (RT) | Solis BioDyne, Tartu, Estonia); C: کنترل منفی. ۱ تا ۷: استرین‌های Psv1 تا Psv7 جداشده از گال‌های زیتون از شهرستان قزوین استان قزوین، ۸ تا ۱۵: استرین‌های Pcv8 تا Psv15 جداشده از گال‌های زیتون از شهرستان لوشان استان گیلان.

Figure 4. Detection of 14 strains of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolated from oleander galls using Psn specific primers (PsvF/PsvR) on one percent agarose gel. L: 100 bp DNA Ladder Ready to Load (RT) | Solis BioDyne, Tartu, Estonia; C: Negative control; 1-7: Psv1-Psv7 collected from Ghazvin, Ghazvin province; 5-15: Psv5-Psv15 collected from Loshan, Guilan province.



شکل ۵- ردیابی ۱۸ استرین *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (PsnF/PsnR) روی ژل یک درصد. L: استاندارد جرم مولکولی (100 bp DNA Ladder Ready to Load (RT) | Solis BioDyne, Tartu, Estonia); C: کنترل منفی. ۱۶ و ۱۷: استرین‌های Psn16 و Psn17 از شهرستان نور، ۱۸ تا ۲۰: Psn18، Psn19 و Psn20 از شهرستان نوشهر، ۲۱ تا ۲۳: Psn21، Psn22 و Psn23 از شهرستان رویان و ۲۴ و ۲۵: Psn24 و Psn25 از شهرستان سرخرود، H و E، و F: PsnH و PsnD، PsnE و PsnH از شهرستان چالوس و G، F، M، N، O و PsnG، PsnF، PsnL، PsnM، PsnN و PsnO از شهرستان محمودآباد استان مازندران.

Figure 5. Detection of 18 strains of *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* isolated from oleander galls using Psn specific primers (PsnF/PsnR) on one percent agarose gel. L: 100 bp DNA Ladder Ready to Load (RT) | Solis BioDyne, Tartu, Estonia; C: Negative control; 16-17: Psn16 and Psn17 collected from Noor; 18-20: Psn18-Psn20 collected from Noshahr; 21-23: Psn21-Psn23; 24 and 25 collected from Roiyan; Psn24 and Psn25 collected from Sorkhroud; E, D, and H: PsnE, PsnD, and PsnH collected from Chaloos; F, G, M, N, and O: PsnF, PsnG, PsnM, PsnN, and PsnO, respectively, isolated from Mahmood-Abad, Mazandaran province.

توالی ۵۰۲ نوکلئوتید از ژن *rpoB* در استرین‌های نماینده نشان داد، توالی این ژن در استرین‌های متعلق به دو پاتووار *Psv* و *Psn*، صددرصد یکسان هستند و در این درخت فیلوژنی تمامی پاتووارهای *P. savastanoi* که روی گیاهان چوبی گال ایجاد می‌کنند از جمله پاتووارهای استرین‌های ایرانی این دو پاتووار در یک گروه قرار گرفته‌اند.

بررسی فیلوژنتیکی براساس ۶۱۲ نوکلئوتید از توالی ژن *gyrB* نشان داد، پاتووارهای ایرانی *Psv* و *Psn* بیش از ۹۹ درصد به یکدیگر و به استرین‌های پاتوتیپ *P. savastanoi* *P. savastanoi* pv. *nerii* و *P. savastanoi* ICMP 4352 CFBP 5067 شباهت دارند. البته پاتووارهای *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* و *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolica* از این ۲ گروه تفکیک شدند.

توالی سلسله‌ای ۱۶۴۳ نوکلئوتید از اتصال توالی‌های اصلاح‌شده نواحی *gyrB*، *rpoD* و *rpoB* استرین‌های مورد مطالعه ایجاد و با توالی‌های سلسله‌ای ایجادشده برای دیگر گونه‌های سودوموناس هم‌ردیف شد (شکل ۷).

آنالیز تحلیل توالی چند ژنگاهی (MLSA)

آنالیز تحلیل توالی چند ژنگاهی برای تعدادی از استرین‌های *Psv* و *Psn* با استفاده از توالی‌های مربوط به قطعات تکثیرشده از سه ژن خانه‌دار *gyrB*، *rpoB* و *rpoD* با استفاده از آغازگرهای مربوط انجام شد و توالی‌ها در بانک ژن NCBI ثبت شدند (جدول ۳). توالی ۵۲۷ نوکلئوتید از ژن *rpoD* در استرین‌های مورد مطالعه بیش از ۹۸/۸ درصد شباهت بین استرین‌های *Psv* و *Psn* وجود داشت و از بسیاری از پاتووارهای *Pseudomonas syringae* جدا می‌شوند. در داخل این خوشه استرین‌های *Psn25*، *PsnD* و *PsnH* در کنار پاتوتیپ *P. savastanoi* pv. *nerii* CFBP 5067 در یک گروه و استرین‌های *Psv6*، *Psv10* و *Psv15* نیز با *P. savastanoi* ICMP 4352 *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ICMP 4352 *P. savastanoi* pv. *retacarpa* و *P. savastanoi* pv. *fraxini* CFBP 5062 در کنار این استرین‌ها پاتووارهای *P. amygdali*، *P. meliae* استرین *P. syringae* pv. *cerasicola* با فاصله‌ای نه‌چندان زیاد قرار دارند. پاتووارهای *P. savastanoi* pv. *glycinea* و *P. savastanoi* pv. *phaseolica* نیز با فاصله‌ای دورتر در کنار بقیه جای گرفته‌اند.

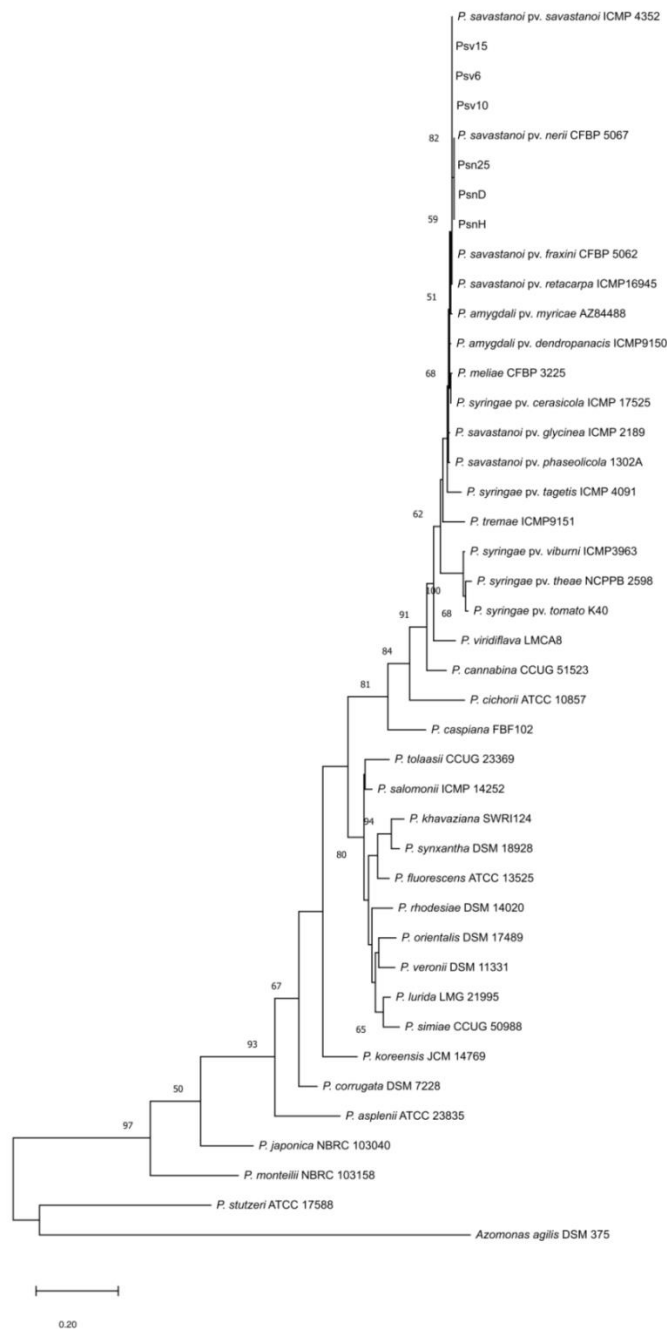
جدول ۳- شماره ثبت توالی ژن‌های خانه‌داری در NCBI

Table 3. The accession numbers of housekeeping genes sequences deposited in GenBank

ژن/استرین Gene/strain	<i>Psv6</i>	<i>Psv10</i>	<i>Psv15</i>	<i>Psn25</i>	<i>PsnD</i>	<i>PsnH</i>
<i>gyrB</i> *	ON755321	ON755322	ON755323	ON755324	ON755325	ON755326
<i>rpoB</i>	ON755330	ON755331	ON755332	ON755333	ON755334	ON755335
<i>rpoD</i>	ON755336	ON755337	ON755338	ON755339	ON755340	ON755341

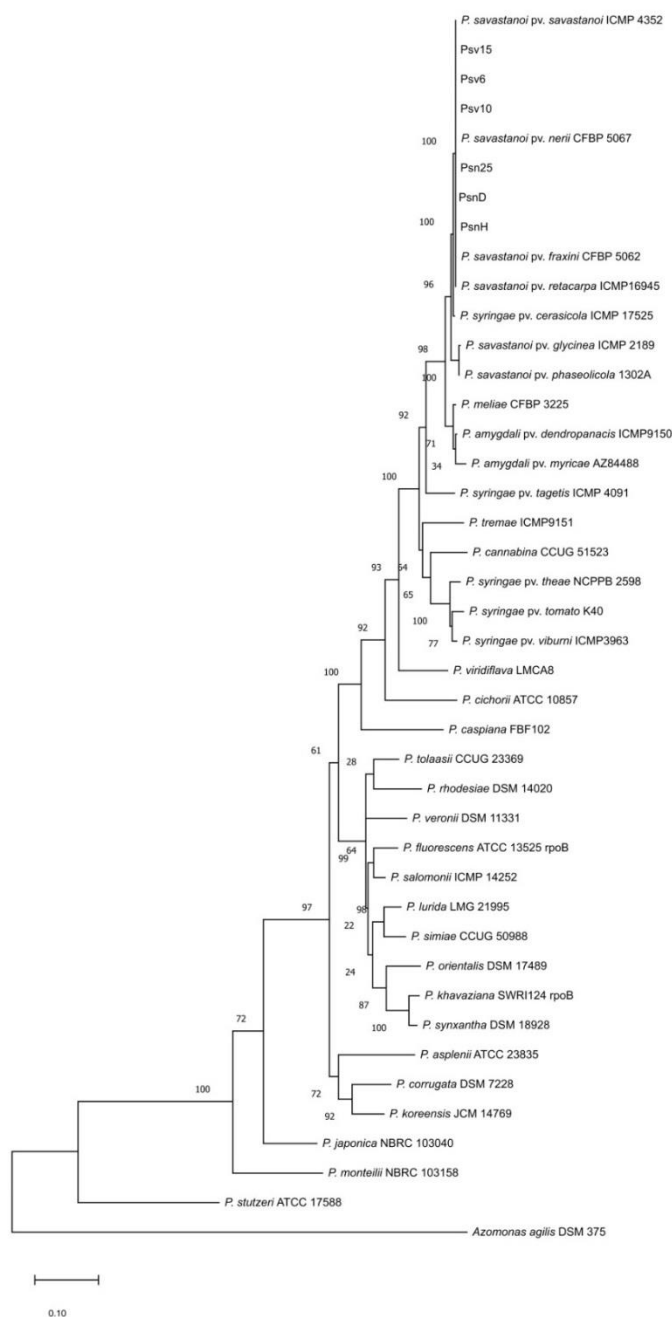
*gyrB**: زیرواحد بتا ژن DNA gyrase، *rpoB*: زیرواحد بتا ژن رمزکننده آنزیم RNA پلیماز، *rpoD*: زیرواحد دلتا ژن رمزکننده آنزیم RNA پلیماز.

gyrB: DNA gyrase, subunit β ; *rpoB*: RNA polymerase, subunit β ; *rpoD*: RNA polymerase, $\sigma 70$ factor.



شکل ۶- درخت فیلوژنی براساس توالی‌های قطعه‌ای از ژن *rpoD* در سودوموناس‌های مختلف و استرین‌های ایرانی *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv6, Psv10, Psv15) و *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Psn25, PsnD, PsnH) به روش Maximum Likelihood با استفاده از مدل Tamura 3-parameter، Gamma distribution (T93+G). گونه *Azomonas agilis* DSM 375 به‌عنوان گروه خارجی استفاده شد.

Figure 6. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial sequence of *rpoD* gene showing the taxonomic position of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv6, Psv10, and Psv15) and *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Psn25, PsnD, and PsnH). The tree was constructed using the Tamura-Nei substitution model with a gamma distribution sites (T93+ G) based on the lowest Bayesian information criterion (BIC) score. *Azomonas agilis* DSM 375 used as outgroup.



شکل ۷- درخت فیلوژنی مربوط به مقایسه تلفیقی توالی قطعه‌ای از ژن‌های *rpoD*، *gyrB* و *rpoB* در سودوموناس‌های مختلف و استرین‌های ایرانی *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv6، Psv10، Psv15) و *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Psn25، PsnD، PsnH) است.

این درخت با استفاده از مدل Maximum Likelihood با استفاده از مدل Gamma، Tamura 3-parameter، به روش Maximum Likelihood (T93+G+I) distribution and invariant sites (T93+ G+ I) ساخته شده است. *Azomonas agilis* DSM 375 به عنوان گروه خارجی استفاده شد. Figure 7. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial sequences of *rpoD*, *gyrB* and *rpoB* genes showing the taxonomic position of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv6, Psv10, and Psv15) and *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Psn25, PsnD, and PsnH). The tree was constructed using the Tamura-Nei substitution model with a gamma distribution and invariant sites (T93+ G+ I) based on the lowest Bayesian information criterion (BIC) score. *Azomonas agilis* DSM 375 used as outgroup.

(HR) در توتون که به طور سنتی برای گونه *P. syringae* استفاده می‌شود (Lelliott et al., 1966)، نشان داد با توجه به اینکه این استرین‌ها در آزمون‌های تولید لوان، آنزیم‌اکسیداز، آنزیم آرژنین‌دی‌هیدرولاز و پوسیدگی سیب‌زمینی منفی و تنها در آزمون فوق‌حساسیت در توتون و شمعدانی مثبت بودند، بنابراین، این دو گونه در گروه (Ib) در آزمون LOPAT جای می‌گیرند. تمامی استرین‌ها کاتالاز مثبت بودند. هیچ‌یک از استرین‌ها قادر به تجزیه هیدرولیز نشاسته و تولید ایندول و رشد در نمک طعام سه درصد نبودند که با نتایج سایر پژوهشگران (Schaad et al., 2000) مطابقت دارد. براساس نتایج حاصل از آزمون‌های باکتریولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک انجام‌شده، کلیه استرین‌های آزمون‌شده متعلق به گونه *P. savastanoi* تشخیص داده شدند.

تمامی این استرین‌ها، هوازی اجباری و گرم منفی بودند و توانایی تولید رنگدانه فلورسنت را روی محیط کشت King's B داشتند که از ویژگی‌های گونه *P. savastanoi* است (Lelliott et al., 1996). از آنجایی‌که آزمون‌های باکتری‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژی از جمله آزمون بیوشیمیایی LOPAT قادر به تفکیک استرین‌های جداشده از زیتون و خرزهره نبودند، آزمون بیماری‌زایی به‌عنوان اولین و مهمترین عامل متمایزکننده این دو گونه انتخاب شد. این آزمون توانست استرین‌های Psv را از استرین‌های Psn متمایز کند، به طوری‌که استرین‌های Psv تنها در شاخه‌های جوان و غیرچوبی زیتون گال ایجاد کردند و قادر به ایجاد گال روی خرزهره نبودند. اما استرین‌های Psn توانستند علاوه بر خرزهره روی زیتون هم آلودگی ایجاد کنند. بنابراین، براساس این نتایج استرین‌های زیتون به پاتووار Psv و استرین‌های خرزهره به پاتووار Psn تعلق داشتند.

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این دو گونه صحت تشخیص و شناسایی این دو پاتووار ارزیابی شد که این آزمون یک بار با جفت آغازگرهای Psn برای تکثیر قطعه اختصاصی مربوط به پاتووار Psn و بار دیگر با جفت آغازگرهای Psv برای تکثیر قطعه اختصاصی مربوط به پاتووار Psv برای تمامی استرین‌ها انجام شد (Tegli et al., 2010). با استفاده از

براساس مشخصات دامنه میزبانی، تشخیص با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و نیز توالی‌یابی ژن‌های خانه‌دار مشخص شد، استرین‌های جداشده از زیتون که تنها در زیتون گال ایجاد کردند، به پاتووار Psv و استرین‌های جداشده از خرزهره که در دو میزبان خرزهره و زیتون علائم بیماری را ایجاد کردند، به پاتووار Psn تعلق دارند.

بنابراین، براساس درخت‌های فیلوژنی مربوط به ژن‌های *rpoB* و *rpoD* می‌توان نتیجه گرفت، پاتووارهای *savastanoi*، *nerii*، *fraxini* و *retacarpa* با وجود تفاوت‌هایی که در دامنه میزبانی دارند، از لحاظ توالی‌های قطعات ژن‌های یادشده تفاوت چندانی ندارند و استرین‌های ایرانی نیز در کنار آنها قرار می‌گیرند. البته در یکی از درخت‌ها (مربوط به *rpoD*) تفاوت‌های جزئی بین استرین‌های Psv و Psn مشاهده شد. پاتووارهای *P. amygdali* همگی در کنار هم و نزدیک به باکتری‌های تولیدکننده گال در درختان قرار می‌گیرند. گونه *P. meliae* عامل بیماری گال زیتون تلخ در کنار گونه چهار پاتووار *P. savastanoi* که تولیدکننده گال در درختان هستند، قرار گرفت.

بحث

این پژوهش با هدف شناسایی عوامل بیماری‌های گال زیتون و خرزهره در ایران و بررسی و تعیین میزان تنوع موجود در بین این دو پاتووار باکتری انجام شد. در این تحقیق، نمونه‌برداری از استان‌های مازندران، قزوین و گیلان انجام شد. علائم در درختان زیتون و خرزهره به صورت گال و بیش‌رشدی روی شاخه‌های زیتون و شاخه‌ها، برگ‌ها و دم‌برگ خرزهره مشاهده شد که با علائم گزارش‌شده از پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت (Quesada et al., 2010; Schroth et al., 1968b). از میان استرین‌های جداشده، بیماری‌زایی ۱۴ استرین جداشده از زیتون روی زیتون و ۱۸ استرین از خرزهره روی خرزهره و زیتون به اثبات رسید. نتایج بیماری‌زا حاصل از آزمون بیوشیمیایی LOPAT، تولید لوان، واکنش اکسیداز، فعالیت پکتولیتیک روی سیب‌زمینی، فعالیت آرژنین‌دهیدرولاز و توانایی ایجاد پاسخ حساسیت بیش از حد

تحلیل توالی بخشی از ژن *rpoD* توانست استرین‌های *P. savastanoi* pv. *nerii* CFBP با *PsnH* و *PsnD*، *Psn25* 5067 را در کنار هم در یک گروه و استرین‌های *Psv6*، *Psv10* و *Psv15* را نیز با *P. savastanoi* pv. *savastanoi* و ICMP 4352 و *P. savastanoi* pv. *retacarpa* در گروهی دیگر قرار دهد. پاتوارهای *P. savastanoi* pv. *glycinea* و *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* نیز با فاصله‌ای دورتر در کنار بقیه جای گرفته‌اند. تجزیه و تحلیل توالی ژن *rpoB* نشان داد، تمامی پاتوارهای *P. savastanoi* که روی گیاهان چوبی ایجاد گال می‌کنند از جمله پاتوارهای *nerii savastanoi*، *retacarpa* و *fraxini* همگی به همراه استرین‌های *Psn25*، *PsnD* و *PsnH* و استرین‌های *Psv6*، *Psv10* و *Psv15* در کنار هم و در یک گروه قرار گرفته‌اند و هیچ‌گونه تفکیکی بین آنها انجام نشده است. آنالیز ژن *gyrB* نشان داد، این ژن نمی‌تواند پاتوارهای *nerii savastanoi*، *fraxini* و *retacarpa* را از هم تفکیک کند.

Gardan و همکارانش (۱۹۹۹) براساس هیبریداسیون DNA-DNA (DDH)، گونه‌های *P. syringae* را در ۹ گونه ژنومی قرار دادند. در مطالعات فیلوژنتیکی بعدی مشخص شد، گونه *P. syringae* دارای ۱۳ فیلوگروپ (PGs) است که شامل ۱۵ گونه مختلف سودوموناس و حدود ۶۵ پاتوار براساس دامنه میزبان گیاهیست. پاتوارهای *P. savastanoi* به یک گروه فیلوژنتیکی بزرگ شامل ۲۵ پاتوار و چهار گونه دیگر سودوموناس، پاتوارهای *Psn*، *Psv*، *Psf* و *Psr* و نیز پاتوارهای *glycinea* و *phaseolicola* تعلق دارد، این گروه را در مجموع گونه *P. amygdali* می‌نامند (Gardan et al., 1999; Nowell et al., 2014; Baltrus et al., 2017). این گروه فیلوژنتیکی را گونه ژنومی ۲ (Gardan et al., 1999) و فیلوگروپ ۳ (Baltrus et al., 2017) هم می‌نامند و تنها گروهی از مجموعه *P. syringae* است که باعث ایجاد گال در میزبان‌های چوبی می‌شود. پاتوارهای *Psv*، *Psn*، *Psr*، *P. meliae* و *P. tremae* و پاتوارهای *cerasicola*، *daphniphylli*، *dendropanacis* و *myricae* از *P. syringae* در این گروه قرار دارند

آغازگرهای اختصاصی *Psn* قطعه مورد نظر ۳۴۹ جفت‌بازی در استرین‌های خرزهره و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Psv* قطعه مورد نظر ۳۸۸ جفت‌بازی که به ترتیب مربوط به پاتوارهای *Psn* و *Psv* بودند، تکثیر شد. این نتایج با نتایج Tegli و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد.

تجزیه و تحلیل توالی چند ژنگاهی (MLSA) (Maiden et al., 1998) ثابت کرده است که یک رویکرد قدرتمند برای تمایز سویه‌ها و گونه‌های سودوموناس‌ها وجود دارد، همچنین استفاده برای تعیین ارتباط آنهاست (Sarkar & Guttman, 2004; Bull et al., 2011; Chapman et al., 2012; Berge et al., 2014; Glaeser & Kämpfer, 2015; Gomila et al., 2015; Kaluzna et al., 2016; Straub et al., 2018; Visnovsky, et al., 2019). از تجزیه و تحلیل توالی هفت ژنگاه شامل *rpoD*، *gyrB*، *gapA*، *gltA*، *pgi*، *pfk*، *cts* و *acn* برای شناسایی استرین‌های سودوموناس استفاده شده است (Sarkar & Guttman, 2004). بررسی‌های دیگر نشان داده است، توالی ترکیبی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* (Yamamoto et al., 2000) یا فقط توالی بخشی از ژن *rpoD* به تنهایی می‌تواند جایگاه تاکسونومی سودوموناس‌ها را به خوبی نشان دهد (Parkinson et al., 2011; Mulet et al., 2010).

در هیچ‌یک از این مطالعات انجام شده در ایران، تنوع ژنتیکی پاتوارهای *Psv* و *Psn* استفاده از آنالیز توالی‌های چند ژنگاه مطالعه نشده است. در این تحقیق سعی شده است با استفاده از آنالیز توالی‌های چند ژنگاه، امکان تفکیک و تمایز این دو گونه مورد بررسی و آزمون قرار گیرد. مطالعات MLSA برای استرین‌های نماینده دو پاتوار *Psv* و *Psn* با استفاده از توالی‌های مربوط به قطعات تکثیر شده از سه ژن خانه‌داری *gyrB*، *rpoB* و *rpoD* نشان داد، تمامی پاتوارهای *P. savastanoi* با پاتوارهای *P. amygdali* بسیار شبیه هستند. علاوه بر آن، گونه *P. meliae* و پاتوار *P. syringae* pv. *cerasicola* عامل تولید گال درختان گیلاس در این گروه قرار دارند. این نتایج مؤید نتایج سایر پژوهشگران در گروه‌بندی و تفکیک این گونه است (Gardan et al., 1999; Berge et al., 2014; Gomila et al., 2017).

منابع مورد استفاده

- Anonymous., 2021. Agricultural Statistics, available at <https://maj.ir/Dorsapax/userfiles/Sub65/Amarnamehj3-1399-sh.pdf>.
- Ayers, S.H., Rupp, P. and Johnson, W.T., 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. U. S. Dept. Agric. Bull. No. 782.
- Baltrus, D.A., Mccann, H.C. and Guttman, D.S., 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant Pathology, 18: 152-168.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C. and Sands, D.C., 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. PloS One 9, e105547.
- Bull, C.T., Clarke, C.R., CAI, R., Vinatzer, B.A., Jardini, T.M. and Koike, S.T., 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. Phytopathology, 101: 847-58.
- Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martinez-Gil, M., Moreno-Perez, A., Pintado, A. and Ramos, C., 2017. Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. Frontiers in Plant Science, 8: 1089.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. and Giorio, G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics; Heidelberg, 104(2-3): 301-307.
- Chapman, J.R., Taylor, R.K., Weir, B.S., Romberg, M.K., Vanneste, J.L., Luck, J. and Alexander, B.J.R., 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Phytopathology, 102: 1034-1044.
- Conde, C., Delrot, S. and Gerós, H., 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. Journal of Plant Physiology, 165: 1545-1562.
- Cowan, S.T., 1974. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 67-83.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu-Ghorrah, M.A., 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 and Evolutionary Microbiology, 42(4): 606-612.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. and Grimont, D., 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. *P. syringae* pv. پاتووار (Lamichhane et al., 2014). *Prunus cerasicola* روی تنه و شاخه‌های درختان گیلاس (*vedoensis*) گال ایجاد می‌کند. این بیماری اولین بار در سال ۲۰۰۰ از استان‌های میازاکی و ساگا، کیوشو ژاپن گزارش شد. سطح گال‌های جوان به نسبت صاف و قهوه‌ای روشن است، اما پس از گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای تیره و خشن در می‌آیند (Kamijunten et al., 2000). پاتووارهای *P. savastanoi* pv. *glycinea* و *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* هر چند از گونه *P. savastanoi* هستند، اما فاصله آنها با بقیه پاتووارهای یاد شده بیشتر است. البته نوع میزبان و علائمی که این دو پاتووار ایجاد می‌کنند نیز متفاوت از بقیه است. این دو پاتووار روی میزبان‌های خود گال ایجاد نمی‌کنند.
- در پژوهشی دیگر با تجزیه و تحلیل ۱۲۴ استرین از Psv از ۱۵ کشور با روش rep-PCR ساختار ژنتیکی جمعیت Psv بررسی شد (Morettia et al., 2017). به علاوه، در این پژوهش با استفاده از روش MLST، ۲۷۸۸ جفت باز از ژن‌های *gapA*، *gltA*، *gyrB* و *rpoD* بررسی و در بین ۷۷ استرین نماینده، تنها یک جایگاه متغیر گزارش شد. با بررسی بیماری‌زایی استرین‌ها مشخص شد برخی از آنها قادر هستند گال‌هایی تولید کنند که ده برابر بزرگ‌تر از برخی استرین‌ها باشد. به طور کلی نتایج نشان داد، جمعیت امروز Psv در نتیجه گسترش و تکثیر یک سویه واحد است که انتقال آن به کشورهای غیرآلوده به مرور زمان موجب ایجاد بیماری و گسترش آن در نقاط مختلف جهان شده است و تغییرات ژنتیکی *P. savastanoi* طی تکامل آن به وجود آمده است (Morettia et al., 2017).
- بنابراین، قرار گرفتن پاتووارهای *P. amygdali* در کنار پاتووارهای *P. savastanoi* تولیدکننده گال در درخت‌های فیلوژنتیک حاصل از تجزیه و تحلیل توالی چند ژنگاهی *rpoB*، *gyrB* و *rpoD* و جای گرفتن استرین‌های ایرانی مولد گال در زیتون و خرزهره در آن نشان‌دهنده اعتبار گونه‌های ژنومی و Phylogenetic group برای پاتووارهای *P. syringae* توسط پژوهشگران مختلف است (Gardan et al., 1999; Berge et al., 2014; Gomila et al., 2017).

- Giménez-Morera, A., Pulido, M., Di Prima, S. and Cerdà, A., 2018. Straw mulch as a sustainable solution to decrease runoff and erosion in glyphosate-treated clementine plantations in Eastern Spain. An assessment using rainfall simulation experiments. *Catena*, 174: 95-103.
- Khezri, M., Ghasemi, A. and Ahangaran, A., 2019. Detection and characterization of endophytic bacteria causing knot in young olive trees. *Acta agriculturae Slovenica*, 113(1): 109-119.
- Klement, Z., Farkas, G.L. and Lovrekovich, L., 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, 178: 703.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547.
- Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.M. and Morris, C.E., 2014. Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Advances in Agronomy*, 126: 235-295.
- Lelliott, R., Billing, E. and Hayward, A., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, 29: 470-489.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K. and Caugant, D. A., 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 3140-3145.
- Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L. and Surico, G., 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 101-112.
- Morettia, C., Vinatzerb, B., Onofria, A.A., Valentini, F. and Buonauro, R., 2017. Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology*, 66: 595-605.
- Moula, I., Boussadia, O., Koubouris, G., Hassine, M.B., Boussetta, W., Van Labeke, M.C. and Braham, M., 2020. Ecophysiological and biochemical aspects of olive tree (*Olea europaea* L.) in response to salt stress and gibberellic acid-induced alleviation. *South African Journal of Botany*, 132: 38-44.
- Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(6): 469-478.
- Ghasemi, A., Salehi, S., Shahriari, D. and Baniameri, V., 2006. Occurrence of oleander knot disease (*Nerium oleander*) in Tehran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42: 703-704 (In Persian).
- Glaeser, S.P. and Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38: 237-245.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., Garcia-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.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E., 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 214.
- Hall, T.A., 1999, January. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*, London, Information Retrieval Ltd., c1979-c2000, 41(41): 95-98.
- Hugh, R. and Leifson, E., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26.
- Iacobellis N.S., 2001. Olive knot. In: Maloy, O.C., Murray T.D. (Eds). *Encyclopedia of Plant Pathology*. Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 714-715.
- Iacobellis, N.S., Caponero, A. and Evidente, A., 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathology*, 47(1): 73-83.
- Janse, J.D., 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* II. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology*, 11(7): 425-438.
- Janse, J.D., 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* ex Smith subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on Oleaceae and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(2): 166-169.
- Kałużna, M., Willems, A., Pothier, J.F., Ruinelli, M., Sobiczewski, P. and Puławska, J., 2016. *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Systematic and Applied Microbiology*, 39: 370-377.
- Kamiunten, H., Nakao, T. and Oshida, S., 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *Cerasicola*, pv. Nov., the causal agent of bacterial gall of cherry tree. *Journal of General Plant Pathology*, 66(3): 219-224.
- Keesstra, S.D., Rodrigo-Comino, J., Novara, A.,

- Sisto, A. and Iacobellis, N.S., 1999. La "Rogna dell' olivo": aspetti patogenetici, epidemiologici e strategie di lotta. *Olivo and olio*, 2(12): 32-38.
- Smith, E.F., 1920. Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. *Phytopathology*, 12: 271-278.
- Smith, E.R. and Rorer, J.B., 1904. The olive tubercole. *Science* 480 (XIX): 416-417.
- Straub, C., Colombi, E., Li, L., Huang, H., Templeton, M.D., McCann, H.C. and Rainey, P.B., 2018. The ecological genetics of *Pseudomonas syringae* from kiwifruit leaves. *Environmental Microbiology*, 20: 2066-2084.
- Surico, G., 1977. Histological observations on olive knots. *Phytopathologia Mediterranea*, 16: 109-125.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N. and Isaka, M., 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.
- Taghavi, M. and Hasani, S., 2012. Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* the causal agent of winter jasmine gall in Iran. *Iran Agricultural Research*, 31(1): 39-48.
- Taghavi, S.M. and Ghasemi, Y., 2010. Etiology of chinaberry gall disease in Iran. *Iran Agricultural Research*, 29(1-2): 14-20.
- Tayeb, L., Elisabeth, A., Grimont, F. and Grimont, P., 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for identification of isolates. *Research in microbiology*, 156: 763-73.
- Tegli, S., Cerboneschi, M. and Libelli, I.M., 2010. Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. *BMC Microbiology*, 10: 156.
- Thornely, M.J., 1960. The differentiation of *pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 23: 37-52.
- Visnovsky, S.B., Marroni, M.V. and Pushparajah, S., 2019. Using multilocus sequence analysis to distinguish pathogenic from saprotrophic strains of *Pseudomonas* from stone fruit and kiwifruit. *European Journal of Plant Pathology*, 155: 643-658.
- Yaish, MWF., 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in common bean. *Euphytica*, 152: 397-404.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S., 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146(10): 2385-2394.
- Environmental Microbiology*, 12: 1513-1530.
- Nowell, R.W., Green, S., Laue, B.E. and Sharp, P.M., 2014. The extent of genome flux and its role in the differentiation of bacterial lineages. *Genome Biology and Evolution*, 6: 1514-1529.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J. and Elphinstone, J., 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathology*, 60: 338-344.
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A. and López, M.M., 1998. La tuberculosis del olivo: diagnóstico, epidemiología y control. *Phytoma-España*, 102: 177-179.
- Quesada, J.M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C.I., Carbonell, E.A. and López, M.M., 2010. Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection*, 29: 1413-1420.
- Rademaker, J.L.W. and De Bruijn, F.J., 1997. Characterization and classification of microbes by rep-pcr genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis chapter 10, p. 151-171. In: Caetano-Anollés, G., and Gresshoff P.M. (Eds.). *DNA markers: protocols, applications and overviews*. J. Wiley & Sons, inc., USA.
- Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragon, I.M. and Murillo, J., 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13: 998-1009.
- Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Muñoz, A. and Ramos, C., 2008. In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology*, 98(7): 815-822.
- Salman, M., Greenhut, R., Preece, J., Ferguson, L. and Kluepfel, D., 2020. Field evaluation of olive (*Olea europaea*) genotypes for resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Plant Pathology*, 102: 663-670.
- Sarkar, S.F. and Guttman, D.S., 2004. Evolution of the Core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1999-2012.
- Schaad N.W., Jones J.B. and Chun, W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd. Ed. St. Paul, MN, USA. Amer Phytopathol Soc Press, 373p.
- Schroth, M.N., Hildbrand, D.C. and Reilly, H.J., 1968a. Off-flavor of olives from trees with olive knot tumors. *Phytopathology*, 58: 524-5.
- Schroth, M.N. and Hildebrand, D.C., 1968b. A chemotherapeutic treatment for selectively eradicating crown gall and olive knot neoplasms. *Phytopathology*, 58(6): 848-854.

Phenotypic and genotypic characteristics and host range of *Pseudomonas savastanoi* strains, the causal agents of olive and oleander trees

G. Poormohammadi¹, A. Alizadeh Aliabadi^{2*}, N. Falahi Charkhabi^{3*} and A. Ghasemi⁴

1- MSc. Student, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

2* - Corresponding author, Associate Prof., Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, E-mail: aalizadeh1340@yahoo.com

3* - Corresponding author, Assistant Prof., Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran, E-mail: falahicharkhabi@ut.ac.ir

4- Assistant Prof., Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 12.02.2022

Accepted: 09.07.2022

Abstract

Olive tree (*Olea europaea*) as an oily plant and oleander (*Nerium oleander*) as an ornamental and evergreen shrub are grown in Iran. Olive and oleander knot diseases are caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) and *P. savastanoi* pv. *nerii*, respectively. Oleander gall samples were collected from Mazandaran province and olives knots were received from Guilan and Qazvin provinces. Symptoms including swollen lumps with a spongy, irregular appearance were observed on various host tissues, including petioles, branches, twigs, trunks, and leaflets. Fifteen and 180 strains isolated from olive and oleander galls, respectively on King's B medium after 48 hours incubation at 28°C. Pathogenicity of 14 and 18 strains were confirmed on two-years-old olive and oleander seedlings, respectively. Moreover, four strains isolated from oleander were able to induce gall on olive trees. All strains were Gram-negative and catalase-positive. Strains were negative for levan production, oxidase, potato rot, and arginine dihydrolase activities and positive in production of hypersensitivity reaction on tobacco. The 388 and 349 bp products were amplified in PCR using PsvF/R and PsnF/R primer pairs in Psv and Psn strains, respectively. Phylogenetic analyses based on the sequence of three house-keeping genes including *rpoB*, *rpoD*, and *gyrB* indicated that representative strains grouped with *P. savastanoi* pathovars.

Keywords: Iran, LOPAT test, MLSA, *Pseudomonas*.