مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۲۲۲-۲۱۱)

بررسی فنوتیپی و بیماری‌زایی عوامل بیماری بلاست مرکبات در استان‌های شمال ایران

فرید بیکی[۱]، حشمت اله رحیمیان[۲*]، ابراهیم محمدی گل تپه[۳]، مسعود شمس بخش[٤]، علی برزگر[٥]، آنتونی بوسکت[٦]، النا گارسیا والدس[۷] و جرج لالوکات[۸]
۱ ، ۳، ٤، دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ،
۲، ٥، استاد و استادیار ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
٦، ۷، ۸، گروه میکروبیولوژی دانشگاه UIB، اسپانیا
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱ – تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۱۱)

چکیده

بیماری بلاست، یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در شمال کشور است که به وسیله دو گونه *Pseudomonas* ایجاد می‌شود. به منظور بررسی پراکنش گونه‌های عامل یا همراه بیماری در مناطق مختلف استان مازندران و مناطقی از استان‌های گیلان و گلستان و نیز بررسی تنوع فنوتیپی و تفاوت در پرآزاری، جدایه‌های بیمارگر در سال‌های۸۹-۱۳۸۷ از درختان آلوده جمع‌آوری شدند. پس از جدا و خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زائی روی برگ‌های نارنج (*Citrus aurantium*)، ۱۱۵ جدایه بیماریزا به‌دست آمد. بر اساس خصوصیات بیوشیمیائی، جدایه‌ها در ۱٦ گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه‌ها در تولید لوان، لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و آرژی‌نین دی‌هیدرولاز متغیر، در ایجاد فوق حساسیت در توتون مثبت و در آزمون تولید اکسیداز منفی بودند. تعدادی از گروه‌ها با وصف داشتن توانائی در لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، شباهت چندانی با *P. viridiflava* نداشتند. بر پایه ویژگی‌های بیوشیمیائی، جدایه‌های گروه‌های XII الی XVI (حدود ۳۹٪ کل جدایه‌ها)، به عنوان جدایه‌های *P. syringae*، و جدایه‌های گروه XI (حدود ۳٪ کل جدایه‌ها)، به عنوان جدایه‌های *P .viridiflava* ، شناسائی شدند. سایر جدایه‌ها تفاوت‌های بیشتری با این دو گروه داشته و شناسایی آنها نیاز به بررسی‌های تکمیلی دارد. در ارزیابی دامنه پرآزاری جدایه‌ها در نارنج، پرتقال واشنگتن ناول(*C. sinensis*, Washington navel) و آلمو(*C. macrophylla*)، بین جدایه‌های گروه‌های مختلف بیمارگر، درجات متغیری از پرآزاری دیده شد.

واژه های کلیدی: بلاست مرکبات، سودوموناس، شدت بیماری، مقاومت

مقدمه

بیماری بلاست(Citrus blast) و لکه سیاه میوه مرکبات(Black pit) از جمله بیماری‌های شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد که عمدتاً به وسیله جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902 ایجاد می‌شود. این بیمارگر از طریق زخم ایجاد شده روی بافت‌های جوان به گیاه حمله می‌کند. علایم بلاست روی پهنک و دمبرگ عموماً به‌صورت نقاط آبسوخته یا نواحی سیاه‌رنگ پدید آمده و از هر طرف گسترش می‌یابد،

* نویسنده مسئول: حشمت اله رحیمیان تلفن: ۰۱۵۱-۳۸۲۲۵۶۷ E-mail: rahimian.h@gmail.com

به‌طوری که از طرف پایین به شاخه و از طرف بالا به بخش فوقانی برگ سرایت می‌کند. اگر آوندهای آبکشی دمبرگ آلوده شوند، برگ‌ها پژمرده شده و می‌ریزند. در محور جوانه با قاعده برگ (محل اتصال به شاخه) زخم بیضی‌شکل قهوه‌ای تا سیاه‌رنگی ایجاد می‌شود. اگر این لکه‌ها دور تا دور شاخه را بگیرند، بخش‌های بالایی آن‌ها خشک خواهد شد. علایم این بیماری درطول فصل رشد و به خصوص در شرایط هوای خنک و بارانی و در دامنه دمایی بین ۸-۲۰°C بر روی سرشاخه‌های جوان شدیدتر خواهد بود.

چنانچه بلاست دیرهنگام رخ دهد، ممکن است با خسارت سرمازدگی اشتباه گردد(Whiteside *et al.*, 1989). همچنین در بیماری لکه سیاه که ناشی از این بیمارگر می‌باشد، لکه‌های فرورفته قهوه‌ای تیره تا سیاه‌رنگ روی میوه‌ها ایجاد می‌شود. این لکه‌ها بیشتر بر روی میوه‌های لیموشیرین و لیموترش مشاهده می‌شود و گاهی اوقات قطر این لکه‌ها تا سه و نیم میلی‌متر هم خواهد رسید(Fawcett *et al.*, 1923). این بیماری از کشورهای ژاپن، افریقای جنوبی، برخی از کشورهای حاشیه مدیترانه و آسیای مرکزی، امریکا و استرالیا گزارش شده است (Smilanick *et al.*, 1996). در ترکیه *P. s.* pv. *syringae* به عنوان بیمارگر شناسایی شده است(Mirik *et al.*, 2005). در ایران، اولین بار این بیماری در سال ۱۳۶۶ بصورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌های پرتقال(*Citrus sinencis* (L.) Osbeck) و آلمو(*C. macrophylla* Wester) از مازندران گزارش شد(Shams-Bakhsh & Rahimian 1997). باکتری از لکه‌های مدور فرورفته و سیاهرنگ روی میوه لیموترش(*C. limon* (L.) Burm f, Eureka) نیز جدا شده بود. این احتمال وجود دارد که باکتری عامل بیماری در بعضی از نقاط مازندران *P. viridiflava* و در نواحی دیگری از استان *P. s.* pv. *syringae* باشد(Shams-Bakhsh & Rahimian 1997). در جنوب ایران، تاکنون گزارشی مبنی بر وجود بیماری ارایه نشده است(Razinataj & Taghavi 2004; Taghavi & Ziaee 2003).

نقوش الکتروفورزی پروتیین‌های سلولی جدایه‌های *P. viridiflava* عامل بلاست مرکبات در مازندران با جدایه استاندارد فرق دارد ولی تا حد زیادی با جدایه‌هایی که در اسفناج و همیشه بهار در مازندران بیماری‌زا هستند هم‌سانی داشته و از نظر خصوصیات فنوتیپی، پلاسمیدی و سرولوژیکی نیز واجد شباهت زیادی با یکدیگر می‌باشند(Goharzadeh & Rahimian 2000). این جدایه‌ها نظیر جدایه‌های همیشه بهار، گوجه‌فرنگی و ریحان روی محیط‌های حاوی سوکروز، لوان تولید می‌کنند(Rahimian & Zarei 2003). بررسی حاضر به منظور تعیین فراوانی و پراکنش گونه‌های عامل یا همراه بیماری بلاست در مناطق مختلف استان مازندران و مناطقی از استان‌های گیلان و گلستان و نیز بررسی تنوع فنوتیپی و دامنه پرآزاری جدایه‌های بیمارگر بر روی برخی از گونه‌های مرکبات انجام شده است.

.مواد و روش ها

نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌بردرای طی دو نوبت از مناطق عمده مرکبات‌کاری شمال کشور (استان‌های گلستان، مازندران و گیلان) انجام شد(جدول۲). نمونه‌برداری اول از اواخر زمستان سال ۱۳۸۷ تا اوایل سال ۱۳۸۸ و نمونه‌بردرای دوم از اواخر زمستان ۱۳۸۸ تا اوایل بهار ۱۳۸۹صورت گرفت. نمونه‌ها متشکل از برگ و سرشاخه‌های مبتلا به بلاست (شکل۱) از درختان پرتقال (*C. sinensis* L. Osbeck) (رقم واشنگتن‌ناول که به اشتباه در ایران تامسون ناول نامیده می‌شود و نیز رقم محلی)، نارنج (*C. aurantium* L.) و نیز تعدادی نمونه از نارنگی پیچ (*C. reticulata* Blanco) و انشو(*C. unshiu* Marc.)، لیموشیرین (*C. limettioides* Tan.) و سیترنج (دورگ *Poncirus trifoliata* L. Raf × *C. sinensis*) بودند.

پس از جمع‌آوری و انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها در جریان ملایم آب شسته شده و سپس از پوست شاخه‌های آلوده و همچنین برگ‌های دارای علایم بیماری قطعاتی به اندازه یک الی دو سانتی‌متر بریده و در تشتک‌های پتری در چند قطره آب سترون خرد گردید. پس از ۳۰-۲۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه یک قطره از سوسپانسیون حاصل با کمک

لوپ روی محیط آگار غذایی حاوی ۰/۵ درصد ساکارز (NAS، ۲۳ گرم نوترینت آگار و ۵ گرم ساکارز در یک لیتر آب) مخطط گردید. سه الی پنج روز پس از نگهداری تشتک‌ها در دمای اتاق (°C ۲۸-۱۸) تک پرگنه‌های ظاهر شده مجدداً روی محیط NAS مخطط و خالص‌سازی شدند. باکتری‌های خالص شده پس از ۴۸ ساعت رشد روی محیط NAS، تا زمان بررسی بیماریزایی و خصوصیات فنوتیپی در دمای°C ۶-۴ نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی‌تر، سوسپانسیون کدری از آنها در آب مقطر سترون تهیه و در دمای اتاق نگهداری شد.

آزمون بیماریزایی

سوسپانسیونی به غلظت 10^8سلول در میلی‌لیتر از رشد ۲۴ ساعته باکتری روی محیط آگار غذایی (تعیین میزان کدری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر و یک بار با کشت رقت‌های مختلف روی محیط NAS و شمارش پرگنه) تهیه و به برگ‌های جوان نارنج و پرتقال واشنگتن‌ناول با روش تزریق، مایه‌زنی گردید(Yessad *et al.*, 1992). برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد و برای تیمار شاهد نیز از آب سترون به جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد. گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه با دمای °C ۱۵ نگهداری گردید. واکنش گیاهان از روز چهارم تا چهاردهم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تکرار آزمون بیماریزایی، کلیه جدایه‌ها در شرایط طبیعی (اردیبهشت ۱۳۸۹) بر روی برگ‌های نارنج مایه‌زنی و واکنش‌ها تعیین گردید.

آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

توانایی تولید رنگ فلورسانس توسط جدایه‌ها بر روی محیط King medium B (King *et al.*, 1954) ارزیابی شد. آزمون LOPAT (Lelliott *et al.*, 1966) جدایه‌ها با بررسی تولید لوان از ساکارز(Schaad *et al.*, 2001) وجود سیتوکروم اکسیداز(Ewing & Johnson 1960)، قابلیت لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و ارزیابی واکنش فوق‌حساسیت (Hypersensitive Reaction) جدایه‌ها با مایه‌زنی سوسپانسونی حاوی حدود 10^8 سلول در میلی‌لیتر به برگ توتون انجام گردید(Klement *et al.*, 1964).

سایر آزمون‌های مربوط به توانائی استفاده از منابع کربن و نیتروژن، با استفاده از کیت‌های بیوشیمیائی Api از شرکت (BioMerieux) و میکروپلیتGN2 از شرکت (Biolog) انجام شد. برای ثبت نتایج کیت اپی، از مقایسه تغییر رنگ و یا تغییر میزان کدورت سوسپانسیون باکتری با جدول استاندارد، استفاده شد. در خصوص میکروپلیت بیولوگ نیز ثبت داده‌ها با استفاده از میکروپلیت ریدر (مدل BioRad Imark) و در طول موج ۵۹۵nm ، انجام شد.

ارزیابی دامنه پرآزاری جدایه‌ها

برای مقایسه دامنه پرآزاری جدایه‌ها بر روی نارنج، پرتقال واشنگتن ناول و آلمو (کلیه جدایه‌های مورد استفاده در این بررسی به همراه تعدادی جدایه جدید)، آزمونی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار به اجرا در آمد. سه هفته پس از سربرداری نهال‌ها، سوسپانسیونی به غلظت 7×10^8 سلول در میلی‌لیتر (تنظیم با کمک اسپکتروفتومتر) از رشد ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط آگار غذایی، تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به برگ‌های هم سن، تزریق گردید(Yessad *et al.*, 1992). دو هفته پس از مایه‌زنی و نگهداری در دمای °C ۱۵ و با رطوبت‌نسبی در حد اشباع، سطح لکه‌های ایجاد شده با کمک دستگاه سطح‌سنج(Dino capture) تعیین گردید.

نتایج

بیماری‌زایی

دو تا چهار روز پس از مایه‌زنی باکتری بر روی پهنک برگ‌ها، لکه‌های سبز مایل به زرد در سطوح بالایی برگ‌ها ظاهر شدند. علایم به‌تدریج گسترش یافته و لکه‌ها از وسط به سمت بیرون به تدریج خشک (نکروزه) شدند. لکه‌های نکروزه به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه در آمده و در بیشتر موارد ناحیه مرکزی آن‌ها در برابر نور نیمه‌شفاف (Translucent) بود. در اطراف برخی از لکه‌ها، نواحی آبسوخته و یا هاله‌ای به رنگ سبز مایل به زرد تا زرد قابل مشاهده بود (شکل۱). در نمونه‌های شاهد که تنها با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، علایمی مشاهده نگردید.

شکل۱- بالا: علایم طبیعی بیماری بلاست مرکبات بر روی برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان پرتقال واشنگتن ناول
وسط: گسترش بیماری در شرائط طبیعی بر روی برگ‌های نارنج در زمان‌های ۷، ۱۳ و ۱۹ روز (از چپ به راست) پس از مایه‌زنی با جدایه *P. syringae* - پایین: مقایسه گسترش بیماری در شرایط گلخانه‌ای در آلمو، پرتقال واشنگتن ناول و نارنج، (از چپ به راست) ۱۴ روز پس از مایه‌زنی با جدایه *P.syringae*

ویژگی‌های فنوتیپی

از کشت نمونه‌های برگ و سرشاخه مرکبات جمع‌آوری شده از مناطق حاشیه دریای خزر که دارای علایم بیماری بودند بیش از ۲۰۰ جدایه فلورسانت با پرگنه‌هایی به رنگ سفید نباتی بژ، زرد و کرم مایل به زرد و لعابدار یا فاقد لعاب به‌دست آمد. پس از ارزیابی اولیه بیماری‌زایی جدایه‌ها در گلخانه و نیز تکرار بررسی در شرایط طبیعی، ۱۱۵ جدایه بیماری‌زا انتخاب شدند. پرگنه اغلب جدایه‌های بیماری‌زا در روی محیط NAS به رنگ بژ بوده و تعداد کمتری از آنها به رنگ کرم مایل به زرد و لعاب‌دار بود. جدایه‌ها همگن نبوده و تفاوت‌هایی از نظر شکل پرگنه، تولید لوان و برخی خصوصیات دیگر داشتند. در آزمون‌های لوپات، جدایه‌ها در تولید لوان، لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و نیز تولید آرژی‌نین دی هیدرولاز، متغیر، در ایجاد فوق‌حساسیت در توتون، مثبت و در آزمون تولید اکسیداز، منفی بودند. سایر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول(۱) خلاصه شده است. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از آزمون‌های فنوتیپی با استفاده از ضریب تشابه ساده (Simple matching coefficient) و روشUPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) و با نرم‌افزار NTSYS pc 2.02e نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه در ۱۶ خوشه متمایز قرار می‌گیرند(شکل۲).

ارزیابی دامنه پرآزاری جدایه‌ها

دو هفته پس از مایه‌زنی، میزان گسترش ناحیه مایه‌زنی شده برگ‌ها با سطح سنج بر حسب میلی‌مترمربع تعیین شد. داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS، تجزیه و تحلیل آماری شدند. اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ بین باکتری‌های به‌کاررفته مشاهده گردید. مقایسه میانگین سطوح لکه‌ها

با روش چند دامنه‌ای دانکن(Duncan) انجام شد(جدول۲). جدایه‌ها بر پایه میانگین میزان گسترش لکه نکروزه ناشی از آنها در سه میزبان نارنج، آلمو و پرتقال واشنگتن ناول، در ۵ گروه به‌ترتیب با سطح لکه ۵-۱، ۱۰-۵، ۱۵-۱۰، ۲۰-۱۵ و ۲۵-۲۰ میلی‌مترمربع، قابل دسته‌بندی بودند.

بحث

بیماری بلاست مرکبات، ابتدا در سال ۱۳۶۷ در برخی نقاط مرکزی استان مازندران مشاهده شد. با بررسی‌های به‌عمل آمده، عامل بیماری، باکتری *P. viridiflava* شناسایی گردید(Shams-Bakhsh & Rahimian 1997). همچنین در گزارشی از غرب استان مازندران عامل بیماری تحت عنوان *P. s.* pv. *syringae* شناسایی شد(Hassanzadeh 1995). در سال‌های پس از گزارش اولیه بیماری، وقوع سالیانه بیماری و شدت آن، نوسان زیادی داشته که می‌توان تغییر شرایط اقلیمی را از مهم‌ترین علل آن به شمار آورد. در سال‌های اخیر بیماری شدت بیشتری پیدا کرده است که احتمال دارد به دلیل بارندگی‌های فراوان و همراه با سردی هوا در اوایل تا اواسط بهار باشد. در نتیجه خسارت‌های وارده به باغات و مصرف سموم مسی برای مقابله با آن سیر صعودی پیدا کرده است. به‌منظور اثبات این تصور یا احتمال اینکه گونه یا پاتووار دیگری از جنس*Pseudomonas* در ایجاد بلاست در غرب مازندران و نیز درگیلان، که کمتر مورد بررسی قرار گرفته است، دخالت دارد، بررسی حاضر صورت گرفت. در بهار ۱۳۸۸و ۱۳۸۹ نمونه‌بردرای از باغات مرکبات استان‌های شمالی انجام شد. در تحقیق حاضر، ۱۱۵ جدایه عامل بیماری بلاست در ۱۶ گروه مجزا از هم، مورد شناسایی و مقایسه قرار گرفته شد.

در بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها و ارزیابی توانایی استفاده از انواع قندها و الکل‌ها، اکثر جدایه‌ها قادر بودند تا در بین انواع قندها، بیشتر از منوساکاریدها استفاده کنند، البته فرم‌های گلیکوزیدی این منوساکاریدها نیز کمتر مورد استفاده قرار گرفت. میزان استفاده از الکل‌ها توسط جدایه‌ها نیز، به مراتب بیشتر از دی، تری و پلی‌ساکاریدهای مورد آزمایش بوده است. در بین کلیه گروه‌ها، گروه‌های I، II و III دارای توانائی پایینی در استفاده از کلیه قندها و الکل‌های مورد بررسی بوده اما توانائی آنها در استفاده از اسیدهای‌معدنی و آلی و نیز اسیدهای‌آمینه به مراتب بیشتر بوده است، به دلیل این تمایز تغذیه‌ای، این سه گروه در شاخه‌ای مجزا در مقایسه با سایر جدایه‌ها، قرار گرفته‌اند و با گونه‌های گزارش شده قبلی، تفاوت‌های مشهودی دارند.

سودموناس‌های مرتبط با گیاهان را می‌توان در سه شرائط محیطی مختلف یافت. برخی بر روی سطوح گیاهان، گروهی در اطراف ریشه و در خاک و برخی نیز در داخل بافت گیاهی و در فضاهای بین سلولی گیاهان وجود دارند(Beattie & Lindow 1999). نتایج بررسی‌های گذشته نشان می‌دهد که اجداد سودوموناس قادرند تا از طیف وسیع‌تری از متابولیت‌ها استفاده نمایند. همچنین سودمومونا‌س‌های بیماری‌زای گیاهی در مقایسه با سایر سودوموناس‌ها، از منابع غذائی محدودتری استفاده می‌کنند، بطوریکه این گروه از لحاظ تغذیه‌ای خود را با ترکیباتی که به مقادیر بیشتری در سطوح و در داخل بافت گیاهی وجود دارد، سازگار کرده‌اند(Mithani et al., 2011). به نظر می‌رسد جدایه‌های*P. syringae* قادر به استفاده از اسیدآمینه-هائی با زنجیره منشعب و نیز اسیدآمینه‌های سولفوردار که در آپوپلاست و ترشحات گیاهی به میزان نسبتاً کم وجود دارند، نباشند (Mithani et al., 2011). اما جدایه‌های *P. syringae* می‌توانند از اسید آمینه‌هائی که در آپوپلاست گیاهی فراوان‌تر می‌باشند (نظیر آسپارتات، گلوتامات، گلوتامین، سرین، آلانین و پرولین)، به عنوان منابع نیتروژن و کربن استفاده کنند(Rico & Preston 2008). در برگ مرکبات، به غیر ازاسیدهای‌آمینه مورد اشاره، آسپاراژین، لیزین، ترئونین و گلیسین نیز با مقادیر فراوان وجود دارد(Erickson 1968). در این بررسی نیز تمام گروه‌ها قادر بودند تا از این اسیدهای‌آمینه (آلانین، پرولین، آسپارژین، ال‌سرین، آسپارتیک‌اسید، گلوتامیک‌اسید) استفاده نمایند با این استثناء که تنها ۶۲ درصد از گروه‌های مورد بررسی قادر به استفاده از اسیدآمینه ال‌ترئونین بوده‌اند. در برگ مرکبات اسیدهای‌آمینه هیستیدین، لئوسین، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، تیروزین و والین نیز به مقدار کمتری وجود

دارند(Erickson 1968) و نتایج استفاده از آنها در این بررسی نیز متغیر بوده و اکثر جدایه‌ها نتوانستند تا از تریپتوفان و ال‌فنیل‌آلانین استفاده کنند ولی قادر بودند تا از ال‌لوسین (از اسیدهای‌آمینه گروه آلیفاتیک) و ال‌هیستیدین (از اسیدهای آمینه گروه قطبی-بازی) استفاده کنند. هر چند آسیدهای‌آمینه سیستئین و اورنیتین در برگ مرکبات شناسائی نشده‌اند(Erickson 1968)، اما نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که اکثر گروه‌ها (به‌غیر از XI ، XII، XIII و XIV) ژن متابولیسم ال‌اورنیتین را دارند، شاید این گروه‌ها قادر به تولید بیماری در گیاهان دیگر بوده و یا از لحاظ تکاملی، به اجداد خود نزدیک‌تر باشند. به غیر از چند مورد اخیر، نتایج کلی آزمون بیوشیمیائی نشان می‌دهد که ارتباط تغذیه‌ای خوبی بین مرکبات و جدایه‌های به‌دست آمده وجود دارد.

جدول۱- ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های باکتری جدا شده از مرکبات در استان‌های شمالی کشور

| ویژگی* | واکنش‌های جدایه‌های گروه‌ها و تعداد جدایه در هر گروه | | |

شکل ۲- گروه‌بندی جدایه‌های *Pseudomonas* جداشده از مرکبات مبتلا به بیماری بلاست بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی. رابطه جدایه‌ها از طریق محاسبه ضریب تشابه ساده و ترسیم دندروگرام به‌روش خوشه‌بندی میانگین‌های بی‌وزن (UPGMA) تعیین گردیده است.

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های باکتری *Pseudomonas* spp. جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی ایران و میانگین شدت علایم لکه‌برگی (گسترش آلودگی) بر حسب میلی‌متر مربع و گروه‌بندی آنها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن

کد جدایه	نام شهر	گروه‌ها بر اساس میانگین شدت آلودگی سطح لکه روی برگ (میلی‌متر مربع)															
۱۱۸	جویبار۲	A															۲۴,۱
۱۲۲	نشتارود۲	A											B				۲۳.۰
۶۵	زرگرمحله۲	A											B				۲۲,۸
۶۳	زرگرمحله۲	C											B				۲۱,۵
۱۲۱	بندرگز۱	C															۲۱,۱
۱۱۷	جویبار۲	C											D				۲۰,۵
۱۱۶	کله بست۲	E											D				۱۹,۳
۹۳	رامسر۲	E											D				۱۹,۳
۶۴	زرگرمحله۲	E											F				۱۸,۳
۹۶	آمل۲	E											F				۱۷,۸
۱۰۵	چالوس۲	E				G							F				۱۷,۵
۷۴	بهنمیر۲					G							F				۱۷,۴
۷۳	بهنمیر۲	H				G							F				۱۷,۰
۴۹	بهنمیر۲	H				G							F				۱۶,۹
۸۷	بندرگز۱	H				G							I				۱۶,۶
۳۷	کلاچای۳	H				G					J		I				۱۶,۵
۶۲	زرگرمحله۲	H				G					J		I		K		۱۶,۳
۸۰	گلوگاه1	H				G		L			J		I		K		۱۶,۳
۱۰۶	محمودآباد۲	H				M		L			J		I		K		۱۵,۶
۱۰۷	محمودآباد۲	H				M		L			J		I		K		۱۵,۶
۹۲	لنگرود۳	N				M		L			J		I		K		۱۵,۲
۷۲	بهنمیر۲	N				M		L			J		I		K		۱۵,۲
۶۷	امیرکلا۲	N				M		L			J		I		K		۱۵,۱
۶۱	آمل۲	N			O	M		L			J		I		K		۱۴,۸
۵۲	چالوس۲	N			O	M		L			J				K		۱۴,۸
۴۰	رامسر۲	N			O	M		L					P		K		۱۴,۶
۱۲۴	بابل۲	N			O	M		L					P		K		۱۴,۶
۱۰۴	کلاچای۳	N			O	M		L					P				۱۴,۵
۴۱	تنکابن۲	N			O	M					Q		P				۱۴,۳
۲۸	بابل۲	N			O	M					Q		P		R		۱۴,۲
۱۰۹	ایزده۲	N			O	S					Q		P		R		۱۳,۶
۶۸	امیرکلا۲	N			O	S					Q		P		R		۱۳,۵
۴۸	بهنمیر۲	N			O	S		T			Q		P		R		۱۳,۴
۷۵	بهنمیر۲	U			O	S		T			Q		P		R		۱۳,۳
۷۱	جویبار۲	U			O	S		T			Q		P		R		۱۳,۲
۸۱	گلوگاه۱	U			O	S		T			Q		P		R		۱۳,۱
۹۵	چالوس۲	U			V	S		T			Q		P		R		۱۲,۸
۸۲	گلوگاه۱	U			V	S		T			Q		W		R		۱۲,۷
۵۴	هلوسرا۳	U			V	S		T		X	Q		W		R		۱۲,۶
۱۲	بندپی بابل۲	U			V	S		T		X	Y		W		R		۱۲,۴
۴۳	محمودآباد۲	U			V	S		T		X	Y		W		R		۱۲,۴
۴۲	چالوس۲	U	V	S	T								W		Z		۱۲,۳
۳۲	گرگان۱	U	V	S	T						Y	X	W	A	Z		۱۱,۸
۳۳	گرگان۱	U	V		T						Y	X	W	A	Z		۱۱,۷
۳۹	رامسر۲	U	V	B							Y	X	W	A	Z		۱۱,۶
۵۸	چالوس۲	C	V	B							Y	X	W	A	Z		۱۱,۲
۶۹	جویبار۲	C	V	B							Y	X	W	A	Z		۱۱,۲
۱۰۸	محمودآباد۲	C	V	B							Y	X	W	A	Z		۱۱,۲
۹۷	بهنمیر۲	C		B	D						Y	X	W	A	Z		۱۱,۰
۱۰۲	بابل۲	C		B	D						Y	X	W	A	Z		۱۱,۰
۱۵	قایمشهر۲	C	E	B	D						Y	X	W	A	Z		۱۰,۹
۹۰	حاجی آباد۳	C	E	B	D						Y	X	W	A	Z		۱۰,۹
۱۲۰	گرگان۱	C	E	B	D						Y	X	W	A	Z		۱۰,۹
۱۰۳	بندرگز۱	C	E	B	D						Y	X		A	Z		۱۰,۸
۱۳	بندپی بابل۲	C	E	B	D						Y		F	A	Z		۱۰,۷
۱۱۴	آمل۲	C	E	B	D						G		F	A	Z		۱۰,۶
۷۹	ساری۲	C	E	B	D					H	G		F	A	Z		۱۰,۵
۱۱۱	چمستان۲	C	E	B	D					H	G		F	A	Z		۱۰,۵
۱۱۶	بهنمیر۲	C	E	B	D					H	G		F	A	Z		۱۰,۵
۲۷	بابل۲	C	E	B	D					H	G		F	A	Z		۱۰,۵
۷۷	ساری۲	C	E	B	D					H	G		F	A	Z		۱۰,۵
۲۹	بابل۲	C	E	B	D					H	G		F	A			۱۰,۴
۵۰	ساری۲	C	E	B	D					H	G		F	A			۱۰,۴
۶۰	بابل۲	C	E	B	D					H	G		F	A			۱۰,۴
۱۶	قایمشهر۲	C	E	B	D					H	G		F	A	I		۱۰,۳
۲۰	نشتارود۲	C	E	B	D					H	G		F	A	I		۱۰,۳
۵۵	هلوسرا۳	C	E	B	D					H	G		F	A	I	J	۱۰,۲
۳۰	ساری۲	C	E	B	D					H	G		F	A	I	J	۱۰,۱
۹۴	خرم آباد۲	C	E	B	D	L				H	G		F	A	I	J	۱۰,۰
۹۸	جویبار۲	C	E	B	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۸
۱۱۹	گرگان۱	C	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۵
۲۴	بابل۲	C	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۵
۷۶	بهنمیر۲	C	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۴
۸۹	رودسر۳	C	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۴
۳۶	لنگرود۳	C	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۳
۷۸	ساری۲	O	E	N	D	L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۲
۴۶	بابل۲	O	E	N		L				H	G	M	F	A	I	J	۹,۱
۲۳	بابل۲	O		N	P	L				H	G	M	F	A	I	J	۸,۹
۸۶	بندرگز۱	O		N	P	L				H	G	M	F	A	I	J	۸,۸
۳۱	گلوگاه۱	O		N	P	L				H	G	M		A	I	J	۸,۸
۹۹	کردکوی۱	O		N	P	L				H	G	M		A	I	J	۸,۸
۴۷	آمل۲	O		N	P	L					H	M		A	I	J	۸,۷

ادامه جدول ۲- مشخصات جدایه‌های باکتری *Pseudomonas* spp. جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی ایران و میانگین شدت علایم لکه‌برگی (گسترش آلودگی) بر حسب میلی‌متر مربع و گروه‌بندی آنها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن

۳۴	رودسر۳	L	P	N	O		M	Q	J	I	K	۸،۵	۵۷	بهشهر۲		U	W	V	X	۵،۲
۱۱	بندپی بابل۲	L	P	N	O	R	M	Q	J	I	K	۸،۴	۷	آمل۲		U	W	V	X	۵،۱
۵۶	رامسر۲	L	P	N	O	R	M	Q	J		K	۸،۳	۴	بابل۲		U	W	V	X	۵،۰
۲۵	بابل۲	L	P	N	O	R	M	Q			K	۸،۳	۱۱۵	بابل۲		U	W	V	X	۵،۰
۸۵	کردکوی۱	L	P	N	O	R	M	Q				۸،۲	۱۲۵	بابل۲			W	V	X	۴،۹
۳۵	املش۳		P	N	O	R	M	Q				۸،۱	۹	چمستان۲			W		X	۴،۸
۹۱	گرمابسرا۳		P	N	O	R	M	Q		S		۷،۹	۱۷	چالوس۲		Y			X	۴،۳
۱۹	نشتارود۲		P	N	O	R		Q		S		۷،۸	۱	فریدون‌کنار۲		Y		Z	X	۴،۳
۳۸	کلاچای۳		P	T	O	R		Q		S		۷،۴	۶	آمل۲	A	Y		Z		۳،۱
۱۱۲	چمستان۲		P	T	O	R		Q		S		۷،۴	۱۲۹	گرگان۱	A	Y		Z		۳،۱
۱۱۰	نور۲		P	T		R		Q		S		۷،۳	۵۱	جویبار۲	A	Y		Z		۳،۰
۲۲	ساری۲		P	T		R		Q		S		۷،۳	۲	بابل۲	A	Y	B	Z		۲،۷
۴۴	چمستان۲		P	T		R		Q		S		۷،۲	۱۸	چالوس۲	A		B	Z		۲،۶
۵۹	بابل۲			T	U	R		Q		S		۶،۸	۸	آمل۲	A		B			۲،۳
۱۰۱	بندرگز۱			T	U	R		V		S		۶،۷	۱۲۶	چابکسر۳	A		B			۲،۰
۸۸	بندرگز۱			T	U	W		V		S		۶،۳	۳	بابل۲	A		B			۱،۸
۱۰	بندپی‌بابل۲			T	U	W		V		X		۵،۸	۷۰	بابل۲			B			۱،۳
۲۱	هلوسرا۳			T	U	W		V		X		۵،۷	۱۲۷	چابکسر۳			B			۱،۰
۵۳	هلوسرا۳			T	U	W		V		X		۵،۷	۱۳۰	گرگان۱			B			۱،۰
۸۴	گرگان۱				U	W		V		X		۵،۳	۵	جویبار۲			B			۱،۰
۱۲۸	تنکابن۲				U	W		V		X		۵،۳								

۱-استان گلستان ۲-استان مازندران ۳-استان گیلان

گروه‌های IV، V، VI و XI، بیشترین تعداد جدایه، با قابلیت لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی را داشتند. دو گونه *P. viridiflava* و*P. marginalis* دارای توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی می‌باشند(Schaad *et al.*, 2001). نمی‌توان تنها بر اساس توانایی لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و یا عدم آن، این گونه‌ها را از سایر سودوموناس‌های فلورسنت متمایز نمود، زیرا برخی از پاتوارهای*P. syringae* نیز توانایی تولید پکتیناز درpH خاصی را دارا می‌باشند(Kashyap *et al.*, 2001). در اسپانیا گونه بیماری‌زا و غیر معمولی از *P. viridiflava* گزارش شده که ضمن تولید لوان، توانایی متغیری در لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی دارد و با تغییر رقم سیب‌زمینی، فعالیت پکتولیتیکی آن نیز تغییر می‌کند(Gonzalez *et al.*, 2003). در کره جنوبی نیز ، جدایه‌های غیر متعارفی از *P. viridiflava* از کلزا جداسازی شد که در هر دو ویژگی تولید لوان و فعالیت پکتولیتیکی، متغیر بوده و شبیه جدایه‌های گزارش شده از اسپانیا می‌باشند (Myung *et al.*, 2010). از این‌رو آزمونLOPAT، به تنهایی جهت تفکیک جدایه‌های این دو گونه از سایر سودوموناس‌های فلورسنت به خصوص *P. syringae* مناسب نبوده و شناسایی دقیق نیاز به آزمون‌های تکمیلی دارد. در بین چهار گروه اخیر، هر چند گروه‌های VI و V از نظر تولید لوان، آرژنین دی‌هیدرولارز و توانائی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی مشابه *P. marginalis* مثبت بودند، اما از لحاظ تولید اکسیداز و توانائی ایجاد فوق حساسیت در توتون به ترتیب منفی و مثبت بوده که از این نظر با *P. marginalis* اختلاف داشتند. دو گروه دیگر (IV و XI) نیز، لوان مثبت ولی اکسیداز منفی بودند. از بین چند گروه اخیر با توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، گروه XI، تنها گروهی می‌باشد که آرژی‌نین‌دی هیدرولاز آن منفی است، از این رو، این گروه بر اساس خصوصیات LOPAT و نیز برخی از خصوصیات دیگر، بیشترین شباهت را به *P. viridiflava* دارد. جدایه‌ها در چند

ویژگی از گونه اخیر متمایز هستند، به عنوان‌مثال نمی‌توانند ژلاتین را هیدرولیز کنند ولی قادر به استفاده از یوریدین هستند. به‌علاوه این جدایه‌ها قادر بودند تا از هیدروکسی‌بوتیریک اسید، ال‌آسپارتیک اسید و دی آرابیتول استفاده کنند. لذا می‌توان این گروه را *P. viridiflava* تغییریافته و یا شبه *P. viridiflava* تلقی نمود. پیشتر نیز جدایه‌هایی از *P. viridiflava* در ایران گزارش شده است که توانائی هیدرولیز ژلاتین آن‌ها متغیر بوده است (Rahimian & Zarei 2003; Razinataj & Taghavi 2004). سه گروه بعدی تفاوت‌های بیشتری با جدایه‌های استاندارد *P. viridiflava* داشتند که از جمله می‌توان به توانائی هیدرولیز آرژینین و استفاده از پوترسین، ترهالوز و ان‌استیل گلوکزآمین و نیز عدم استفاده از اریتریتول اشاره نمود. البته دو گروه IV وV نیز قادر بودند از سوکروز اسید تولید نمایند. به نظر می‌رسد این سه گروه به مراتب تفاوت‌های بیشتری را با *P. viridiflava* داشته باشند.

اعضای پنج گروه XII، XIII، XIV، XV، XVI ، لوان مثبت بوده ولی توانائی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی را نداشتند و نظیر *P. syringae* قادر بودند از سوکروز، اینوزیتول، مانیتول، سوربیتول، کونیک‌اسید، لاکتیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید استفاده کنند و اما توانایی مصرف از رامنوز، سلوبیوز، ترهالوز و آدونیتول را نداشتند. برخلاف *P. syringae*، جدایه‌ها در تولید اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین و تولید اسید از دی-گلوکز-۶-فسفات منفی بوده و توانایی استفاده از یوریدین، بتاهیدروکسی بوتیریک اسید و دی‌آرابیتول را داشتند. در بین اعضای این گروه‌ها تفاوت‌های مختصری در ویژگی فنوتیپی قابل مشاهد بود. به عنوان مثال تعدادی از اعضای این گروه‌ها توانائی تولید اسید از ال‌لوسین را داشتند. در کل این پنج گروه بیشترین شباهت را با *P. syringae* دارا می‌باشند. نتایج بررسی‌های دیگران نیز نشان داده که نتایج آزمون‌های میکروپلیت بیولوگ برای شناسایی باکتری‌های فلورسنت تا حدگونه مفید بوده ولی برای تفکیک پاتوارهای *P. syringae* مناسب نمی‌باشد (Krejzar *et al.*, 2004)، لذا جهت تعیین دقیق‌تر جایگاه این گروه‌ها در حد پاتووار، نیاز به بررسی‌های تکمیلی است.

اعضای گروه‌های VII، VIII و IX ورقه‌های سیب‌زمینی را له نکرده، آرژی‌نین‌دی‌هیدرولاز در آنها مثبت بوده و قادر بودند تا از یوریدین استفاده نمایند. تولید اوره‌آز و هیدرولیز اسکولین در آنها مثبت بوده و برخلاف *P. syringae* و *P. viridiflava* از ایتاکونیک اسید، بتا هیدروکسی بوتیریک اسید، ترهالوز، ان‌استیل‌گلوکزآمین، آدونیتول و آرابیتول استفاده می‌کنند. قبلا نیز خزری و همکارن (Khezri *et al.*, 2010) از میزبان‌های مختلف(نیشکر، زردآلو، هلو، بادام، گیلاس، گندم، جو، مینای چمنی، عشقه)، جدایه‌هائی را به عنوان جدایه‌های غیر تیپیک *P. s.* pv. *syringae* معرفی کرده بودند که نظیر اعضای سه گروه اخیر، قادر به هیدرولیز اسکولین نبوده ولی می‌توانستند از ترهالوز، رافی‌نوز و آدونیتول اسید تولید کنند. جدایه‌های متنوع دیگری از *P. s.* pv. *syringae* نیز از ایران گزارش شده‌است. به عنوان مثال از شانکر هسته‌دارن و نیز از بلایت گندم جدایه‌هائی گزارش شد که بر خلاف جدایه‌های مرجع، قادر به استفاده از ال‌لوسین، ملی‌بیوز و آدونیتول بوده ولی توانایی مصرف از استیک‌اسید، پروپیونیک اسید و کوینیک‌اسید را نداشته‌اند(Aldaghi *et al.*, 2010). در بررسی دیگری، جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از مرکبات، از سلوبیوز و آرابیتول اسید تولید کرده و در تولید اسید از رامنوز، ترهالوز، مالتوز، رافی‌نوز، لاکتوز و آدونیتول متغیر بودند، در حالی که جدایه‌های مرجع قادر به مصرف آنها نمی‌باشند (Taghavi & Ziaee 2003). در مجموع به نظر می‌رسد که تنوع بسیاری در بین جدایه‌های مورد بررسی وجود دارد و برای کسب نتایج قطعی، انجام آزمون‌های مولکولی نظیر تعیین ترادف ژنهای خانه‌داری و هیبریداسیون DNA ضروری است.

در ارزیابی پرآزاری روی سه گونه مرکبات(نارنج، واشنگتن ناول و آلمو)، دامنه پرآزاری وسیعی در بین جدایه‌ها مشاهده شده و تعدادی از جدایه‌ها پرآزاری بالایی را نشان دادند. جدایه‌های هر گروه نیز با هم همسان نبوده و تنوع در پرآزاری بین جدایه‌های متعلق به هر گروه، وجود داشت. در مجموع ۲۳ جدایه، شامل یک جدایه از گیلان، سه جدایه از استان گلستان و ۱۹ جدایه از استان مازندران، در گروه پرآزارتر قرار گرفتند.

چنین تنوعی می‌تواند بیان کننده تنوع ژن‌های مقاومت در گیاه و نیز تنوع ژن‌های پرآزاری در باکتری باشد. عوامل مختلفی در بیماری‌زایی و یا میزان پرآزاری در سودوموناس‌ها موثر هستند. بر همکنش متابولیت‌های تیپ ترشحی سوم باکتری با محصولات ژن‌های گیاهی سبب بروز سطوح مقاومت می‌شود(Jakob *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2011). در بررسی حاضر میزان پرآزاری جدایه‌ها، بسته به گونه مرکبات مورد استفاده، متفاوت بوده و گونه‌های مختلف مرکبات نیز سطوح متفاوتی از حساسیت در برابر گسترش هر جدایه باکتری را نشان دادند. در مجموع با در نظر گرفتن کلیه خصوصیات بیوشیمیائی و دامنه‌پرآزاری جدایه‌ها و نیز با در نظر گرفتن سایر نتایج تحقیقات انجام شده بر روی جدایه‌های سودوموناس در مرکبات و نیز گیاهان دیگر، می‌توان اذعان داشت که تنوع زیادی در جدایه‌های سودوموناس بیماری‌زا در مرکبات و تعدادی از میزبان‌های دیگر وجود دارد و برای تعیین دقیق گونه و یا پاتووارهای عامل این بیماری‌ها، انجام تحقیقات تکمیلی ژنتیکی به خصوص تعیین ترادف برخی از ژن‌ها، ضروری می‌باشد.

REFERENCES

1. Aldaghi, M., Rahimian, H., & Mohamadi, M. (2010). Comparison of phenotypic, serological and molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of bacterial canker of stone fruits and blight of cereals. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45(4), 91-93. (In Farsi With English Summary).
2. Beattie, G. A., & Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89(5), 353-359.
3. Erickson, L. C. (1968). Anatomy, physiology, genetics, and reproduction. In W. Reuther, L. D. Batchelor & H. J. Webber. (Ed.), *The Citrus industry*. (pp. 398). University of California Press, Berkley, California, USA.
4. Ewing, W. H., & Johnson, J. G. (1960). The differentiation of *Aeromonas* and C27 cultures from *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 10(3), 223- 230.
5. Fawcett, H. S., Horne, W. T., & Camp, A. F. (1923). Citrus blast and black pit. *California Agricultural Experiment Station Technical Paper*, 5, 1-24.
6. Goharzadeh, A. F., & Rahimian, H. (2000). A comprative study of *Pseudomonas viridiflava* strains isolated from basil, spinach, tobacco, marigold and *Citrus* spp. in Mazandaran province. In: *Proceeding of 14th Iranian Plant Protection Congress*, 5-8 Sept, Isfahan, Iran, p.346. (In Farsi With English Summary).
7. Gonzalez, A. J., Rodicio, M. R., & Mendoza, M. C. (2003). Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2936-2941.
8. Hassanzadeh, N. (1995). Incidence and progress of different diseases incited by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Agricultural Sciences Islamic Azad University*, 1, 5-14. (In Farsi With English Summary).
9. Jakob, K., Goss, E. M., Araki, H., Van, T., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2002). *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae* - Natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(12), 1195-1203.
10. Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227.
11. Khezri, S., Rahimian, H., Ahangaran, A., & Mohammadi, M. (2010). Comparison of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from various hosts with different methods. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(1), 106-110.
12. King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
13. Klement, Z., Farkas, G. L., & Lovreicovich, L. (1964). Hyperseneitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
14. Krejzar, V., Jerabkova, R., & Kudela, V. (2004). Suitability of biolog system for differentiating fluorescent *pseudomonads* associated with premature dying of apricot trees. *Acta fytotechnica et Zootechnica*, 7(Special Number), 147-149.
15. Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29(3), 470-489.
16. Mirik, M., Baloglu, S., Aysan, Y., Cetinkaya-Yildiz, R., Kusek, M., & Sahin, F. (2005). First outbreak

and occurrence of citrus blast disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on orange and mandarin trees in Turkey. *Plant Pathology*, 54(2), 238-238.

17. Mithani, A., Hein, J., & Preston, G. M. (2011). Comparative analysis of metabolic networks provides insight into the evolution of plant pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Pseudomonas*. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 483-499.
18. Myung, I. S., Lee, Y. K., Lee, S. W., Kim, W. G., Shim, H. S., & Ra, D. S. (2010). A new disease, bacterial leaf spot of rape, caused by atypical *Pseudomonas viridiflava* in South Korea. *Plant Disease*, 94(9), 1164-1165.
19. Rahimian, H., & Zarei, A. (2003). A leaf spot and blight of pot marigold incited by variant to *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources of Khazar*, 1(1), 80-89. (In Farsi With English Summary).
20. Razinataj, M., & Taghavi, S. M. (2004). A comparison of *Pseudomonas viridiflava* isolates from different hosts by phenotypic characteristics and pathogenicity in Fars province. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 35(1), 253-263. (In Farsi With English Summary).
21. Rico, A., & Preston, G. M. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), 269-282.
22. Rico, A., Mccraw, S. L., & Preston, G. M. (2011). The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 31-38.
23. Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3th ed.). APS Press, Minnesota, 373 p.
24. Shams-Bakhsh, M., & Rahimian, H. (1997). Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33(3,4), 132-143. (In Farsi With English Summary).
25. Smilanick, J. L., Gouin-Behe, C. C., Margosan, D. A., Bull, C. T., & Mackey, B. E. (1996). Virulence on citrus of *Pseudomonas syring*ae strains that control postharvest green mold of citrus fruit. *Plant Disease*, 80(10), 1123-1128.
26. Taghavi, S. M., & Ziaee, M. (2003). Comparison of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall isolates from different hosts based on phenotypic characteristics, serological properties and pathogenicity. *Journal of Science and Technology of Agricultureand Natural Resources*, 7(1), 199-213. (In Farsi With English Summary).
27. Whiteside, L. O., Garnesy, S. M., & Timmer, L. W. (1989). *Campendium of citrus disease* (2th ed.). American Phytopathology Society Press, Minnesota.
28. Yessad, S., Manceau, C., & Luisetti, J. (1992). A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease*, 76(4), 370-373.