

## بررسی عوامل باکتریایی دخیل در ایجاد عارضه لکه برگی کیوی در ایران

الهه واثقی خوندابی<sup>۱</sup>، پژمان خدایگان<sup>۲\*</sup> و فرید بیکی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۳. استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۵)

### چکیده

به منظور بررسی عوامل باکتریایی ایجادکننده بیماری کله برگی کیوی در ایران نمونه برداری گسترده‌ای در دو سال متوالی از مناطق کیوی خیز استان‌های شمالی کشور انجام شد. از برگ درختان آلوده با علائم مختلف لکه زاویه‌ای قهوه‌ای‌رنگ، لکه سفید با حاشیه قهوه‌ای، لکه نارنجی‌رنگ و لکه‌ی آسوخته با هاله‌ی زرد رنگ در اطراف آن، بیش از ۴۰۰ جدایه باکتریایی جدا و خالص‌سازی گردید. پس از انجام آزمون بیماری‌زایی به روش‌های مختلف، ۱۳۰ جدایه به عنوان بیمارگر شناسایی شد. سپس از میان آن‌ها، بیست و پنج جدایه مشکوک به جنس *Pseudomonas* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی نظیر رنگ و شکل کلنی انتخاب شده و مورد بررسی‌های فنوتیپی و مولکولی قرار گرفت. تمامی جدایه‌ها در آزمون القای واکنش فوق حساسیت در توتون و شمعدانی نتایج مثبت ولی در سایر آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی نتایج متفاوت نشان دادند. این نتایج نشان داد، نیمی از جدایه‌های مورد بررسی، بیشترین شباهت را به گونه‌ی *P. syringae* دارند. همچنین استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی *rRNA* 16S-23S (ITS) به نام *PsaF1/R2* و *PsaF3/R4*، نشان داد که جدایه‌های ۲۰، ۸۶، ۱۰۱، ۱۳۸، ۱۳۲، ۱۱۷، ۱۹۴ و ۲۳۰ به پاتووار *P. syringae* pv. *actinidiae* تعلق دارند. بررسی مترادف توالی ژن *rpoD* در ۱۷ جدایه‌ی دیگر و عدم شباهت آن با هیچ کدام از توالی‌های ژن *rpoD* متعلق به گونه‌های موجود از جنس *Sudomonas* در بانک ژن نشان داد که احتمالاً این جدایه‌ها گونه‌های ناشناخته‌ای از این جنس بوده که تعیین جایگاه دقیق تاکسونومیکی آن‌ها مستلزم بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کیوی، لکه برگی باکتریایی، سودوموناس، ایران.

### Kiwifruit leaf spot disease bacterial facto investigation in north of Iran

Elahe Vaseghi-Khoondabi<sup>1</sup>, Pejman Khodaygan<sup>2\*</sup> and Farid Beiki<sup>3</sup>

1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.

3. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: September 14, 2020 - Accepted: February 3, 2021)

### ABSTRACT

In order to investigate the bacterial factor causing kiwifruit leaf spot disease in Iran, extensive sampling performed in two consecutive years from the kiwifruit growing areas in the northern provinces. More than 400 bacterial strains isolated from the leaves of infected trees with various signs of leaf spot like brown angular spot, white spot with brown border, orange color spot and water soaking spot with yellow penumbra. 130 strains identified as pathogenic factors in different pathogenicity test. Among them, 25 strains were suspicious to have the *Pseudomonas* genus according to morphological properties such as color and shape of the colonis and studed from the phenotypic and molecular view point. All the strains had positive result through the hypersensitive reaction test in tobacco and geranium leaves, but during other phenotypic and molecular tests, they had different results. These tests proved that half of the strains in this study have the most similarity to *P. syringae*. Using two pairs of specific primers that designed based on the 16S-23S rRNA (ITS) sequence, by the name of *PsaF1/R2* and *PsaF3/R4*, made it clear that strains: 20, 86, 101, 138, 132, 117, 194 and 230, are belonging to *P. syringae* pv. *actinidiae*. This experience that *rpoD* gene sequence of other 17 strains and its dissimilarity to any of the *rpoD* gene sequences, belonged to the species of genus *Pseudomonas* in the genebank, proves that these strains are unknown species of *Pseudomonas*, makes it necessary that determind the taxonomic status of these strains further investigations are required.

Keywords: kiwifruit, Bacterial leaf spot, *Pseudomonas*, Iran.

\* Corresponding author E-mail: pkhodaygan@vru.ac.ir

### مقدمه

ایران در دو دهه اخیر یکی از عمده‌ترین تولیدکنندگان کیوی در جهان بوده و توانسته است در میان هفت کشور مطرح در این زمینه، جایگاه ویژه و مناسبی را کسب نموده و از سهم قابل قبولی در بازار جهانی برخوردار گردد. بر اساس آخرین آمار و اطلاعات فائو و مرکز تجارت بین‌الملل در سال ۲۰۱۸ بالغ بر ۲۹ کشور به‌عنوان صادرکننده‌ی این میوه برشمرده شدند. نیوزلند، شیلی، یونان، ایتالیا، بلژیک، هلند و ایران کشورهایی هستند که در بین صادرکنندگان کیوی جهان از مزیت نسبی صادراتی برخوردار می‌باشند (Chizari & Abolhasani, 2012). آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۶ مشخص نموده است سه استان گیلان، مازندران و گلستان به ترتیب بیش‌ترین سطح زیر کشت کیوی را به خود اختصاص می‌دهند که با وسعت ۱۲۱ هزار هکتار باغ، بیش از ۳ هزار تن کیوی در این مناطق تولید می‌شود (Ahmady, 2018). کیوی در ابتدا به‌عنوان گیاهی عاری از بیماری معرفی شده بود، اما به تدریج با توسعه‌ی سطح زیر کشت، تعداد آفات و بیماری‌های این محصول نیز افزایش یافت. بیماری‌های باکتریایی از جمله شانکر باکتریایی کیوی با عامل *P. syringae* pv. *syringae* از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا بوده و تاکنون با اپیدمی شدن این بیماری، خسارت‌های متعددی گزارش گردیده است که توسعه اقتصادی کیوی را به‌شدت به خطر می‌اندازد. اولین علائم سوختگی شکوفه‌های گیاه کیوی ناشی از باکتری بیمارگر *P. viridiflava* در نیوزیلند و در سال ۱۹۹۴ مشاهده شد (Everett & Henshall, 1994). مطالعات بعدی نشان داد که عامل بلایت شکوفه‌ها به‌گونه‌ی *P. savastanoi* شبیه است. هرچند انجام آزمون هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک و برخی آزمون‌های بیوشیمیایی سبب تشخیص دقیق جایگاه تاکسونومیکی نبوده و این سودوموناس‌ها تحت عنوان *Pseudomonas* sp. باقی ماند (Rees-George et al., 2010). در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا عامل ایجادکننده‌ی بیماری نکروز

شکوفه‌های گل، *P. syringae* pv. *syringae* معرفی گردید (Balestra & Varvaro, 1997). این در حالی بود که علائم ایجادشده توسط این باکتری به علائم ایجادشده توسط باکتری *P. viridiflava* به‌عنوان عامل لکه برگی، بلایت و تیرگی شکوفه‌ها (Varvaro et al., 1990) و علائم ایجادشده توسط *P. syringae* pv. *actinidiae* به‌عنوان عامل لکه‌های زاویه‌ای با هاله‌ی نکروتیک و عامل پوسته‌پوسته شدن و خروج شیرابه‌های قرمز از تنه درختان (Scortichini, 1994)، شباهت داشت. در ایران برای نخستین بار در سال ۱۹۹۴ باکتری *P. syringae* pv. *syringae* به‌عنوان عامل شانکر باکتریایی کیوی معرفی گردید (Mazarei & Mostofipour, 1994). اگرچه باکتری *P. syringae* pv. *syringae* قدرت بالایی در نابودی درختان کیوی دارد (Rossetti & Balestra, 2008) ولی تاکنون بیش‌ترین مقدار مرگ درختان کیوی ناشی از *P. syringae* pv. *actinidiae* بوده است (Balestra et al., 2009a). علائم بیماری‌هایی که به‌وسیله باکتری‌های مذکور ایجاد می‌گردد عبارت است از لکه زاویه‌ای برگ، پژمردگی شکوفه‌ها، سوختگی جوانه‌ها، زخم روی شاخه‌های جوان و تنه‌ی درخت می‌باشد که می‌تواند منجر به خروج تراوشات زنگ آلود و قرمز رنگ شود. علائمی همچون لکه زاویه‌ای برگ و پژمردگی شکوفه‌ها صرفاً علائم اختصاصی باکتری *P. syringae* pv. *actinidiae* نیست و توسط گونه‌های دیگری از باکتری‌های جنس سودوموناس از جمله *P. syringae* pv. *syringae* و *P. viridiflava* نیز ایجاد می‌شود (Balestra & Varvaro, 1997). در نیوزیلند و در اوایل نوامبر ۲۰۱۰ لکه برگی و پوستیدگی شکوفه‌ها تنها علائمی بود که باکتری *actinidiae* pv. *syringae* ایجاد نمود (Everett et al., 2011) و با افزایش شیوع اپیدمی خسارت فراوانی به اقتصاد نیوزیلند تحمیل کرد. از آنجاکه صنعت کشت و کار کیوی در ایران از جایگاه اقتصادی بالایی برخوردار بوده و به‌سرعت در حال گسترش می‌باشد توجه به

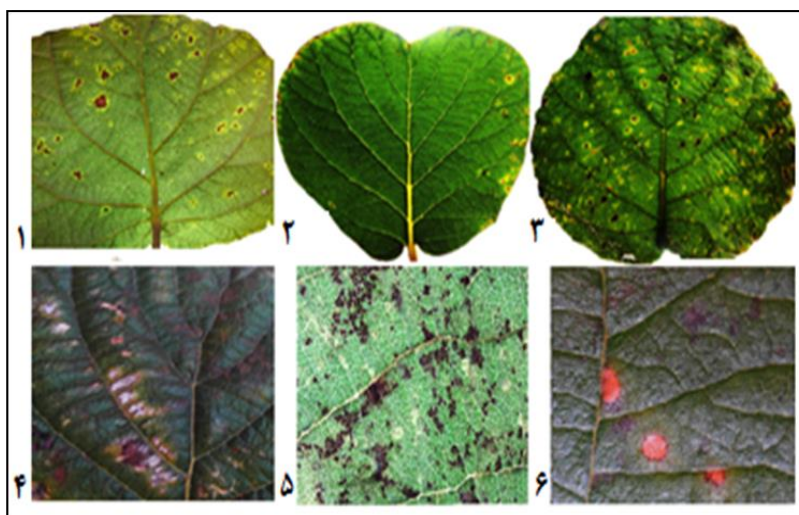
ایران قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی

طی دو نوبت پیاپی از مناطق عمده کیوی کاری در شمال کشور از جمله استان‌های گلستان، مازندران و گیلان نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری اول به مدت چهار ماه متوالی از اواسط بهار تا اواخر تابستان ۱۳۹۶ و نمونه‌برداری دوم طی سه ماه متوالی از اواسط تابستان تا اواسط پاییز ۱۳۹۷ صورت گرفت. نمونه‌هایی متشکل از برگ‌های درخت کیوی رقم هایوارد با علائم مختلف کله‌برگی (تصویر ۱) انتخاب و بلافاصله جهت جداسازی عوامل بیمارگر به آزمایشگاه انتقال داده شد.

عوامل تهدیدکننده‌ی این صنعت اهمیت زیادی دارد. با وجود آنکه وسیع‌ترین و بیشترین مقدار مرگ درختان کیوی تاکنون توسط پاتوژن *actinidiae* *P. syringae* pv. روی داده است (Balestra *et al.*, 2009b) و حضور این بیمارگر در نقاط مختلف کیوی خیز جهان از جمله کشورهای آسیایی مانند ترکیه و چین مشاهده گردیده اما هنوز گزارشی مبنی بر حضور این بیمارگر در ایران ارائه نشده است. با توجه به سطح وسیع تبادلات بین کشوری و عدم وجود سیستم قرنطینه‌ای مقبول، صادرات کیوی به کشورهای نظیر روسیه، عراق، هندوستان، افغانستان ترکیه و علائم لکه برگی مشابه با علائم رؤیت شده در نیوزلند، هدف از این پژوهش شناسایی عوامل باکتریایی ایجادکننده‌ی بیماری لکه برگی کیوی در



تصویر ۱: علائم بیماری و لکه برگی بر روی برگ‌های کیوی. ۱: لکه آسوخته با هاله‌ی زردرنگ، ۲: شروع لکه‌ها از حاشیه، ۳: فراگرفتن کل برگ، ۴: لکه‌ی سفید با حاشیه‌ی قهوه‌ای، ۵: لکه زاویه‌ای قهوه‌ای‌رنگ بدون هاله، ۶: لکه نارنجی آجری رنگ

آگار غذایی<sup>۲</sup>، خالص‌سازی شده و ۴۸ ساعت بعد از رشد جدایه‌ها، به منظور انجام سایر آزمون‌ها در دمای ۶-۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. به منظور نگهداری بلندمدت جدایه‌ها سوسپانسیون آبی نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس و سوسپانسیون کدر آن‌ها درون محیط غذایی مایع<sup>۳</sup> حاوی سی درصد گلیسرول درون فریزر منفی هشتاد درجه سلسیوس نگهداری شد (Schaad *et al.*, 2001).

بافت بیمار برگ همراه با بافت سالم اطراف آن ابتدا به مدت ده ثانیه با هیپوکلرید سدیم نیم درصد ضدعفونی سطحی شده سپس با آب مقطر استریل دو مرتبه و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه شسته و سپس خرد شد و یک قطره از آن روی محیط غذایی کینگز ب<sup>۱</sup> به صورت مخطط کشت گردید. سه الی پنج روز پس از نگهداری تشتک‌ها در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس، کلنی‌های ظاهرشده مجدداً روی محیط کشت

2 Nutrient agar  
3 Nutrient broth

1 King's B

## انجام آزمون‌های بیماری‌زایی

به‌منظور انتخاب دقیق بیمارگرها آزمون بیماری‌زایی با حساسیت و دقت بالا به سه روش مختلف در آزمایشگاه و گلخانه انجام گرفت. در این بررسی جهت اطمینان از روند صحت آزمون از جدایه‌های بیماری-

زای *P. viridiflava*، *P. syringae* pv. *syringe* و *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* بر روی گیاهان دیگر و جدایه‌های ساپروفیت به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: جدایه‌های استفاده‌شده در این پژوهش

نام جدایه	کد کلسیون	میزبان
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	MAFF 30291	کیوی
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringe</i>	ATCC 19310	هسته داران
<i>P. viridiflava</i>	ATCC 1322	مرکبات
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>translucens</i>	ICMP 5752	گندم
<i>Bacillus subtilis</i>	کلکسیون شخصی	باکتری ساپروفیت و فاقد میزبان
<i>P. chlororaphis</i>	کلکسیون شخصی	باکتری ساپروفیت و فاقد میزبان

## روش اول: مایه‌زنی بیمارگر به برگ‌های جداشده کیوی

سوسپانسیونی از هر باکتری با غلظت  $10^4$  سلول در هر میلی‌لیتر، با کمک اسپکتروفتومتر تهیه‌شده و توسط سرنگ استریل به برگ‌های بریده‌شده‌ی جوان کیوی با سن ۱۴ الی ۲۰ روز و بافت نرم و غیر خشبی به‌صورت لکه‌های دایره‌ای شکل به قطر نیم سانتی‌متر تزریق گردید. برگ‌ها در شرایط سترون و با رطوبتی معادل ۹۰ تا ۱۰۰ درصد و دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور به مدت دو هفته قرار گرفته و به‌صورت روزانه ارزیابی گردید (Beiki et al., 2012).

## روش دوم: مایه‌زنی بیمارگر به برگ جدا شده کیوی از قسمت حاشیه‌ی برگ

به منظور امکان سنجی احتمال ورود پاتوژن از روزنه‌های آبی که در حاشیه‌ی برگ‌های کیوی قرار دارد به درون برگ و ایجاد بیماری، مایه‌زنی برگ‌ها توسط باکتری‌های جوان رشد یافته بر روی محیط کشت صورت گرفت و برگ‌ها در شرایط رطوبتی ۸۰-۹۰ درصد و دمای ۲۸-۳۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو هفته نگهداری و به‌طور روزانه بررسی گردید.

## روش سوم: مایه‌زنی بیمارگر بر روی نهال کیوی

سوسپانسیونی از باکتری‌های منتخب، با غلظت  $10^8$  سلول در هر میلی‌لیتر با کمک اسپکتروفتومتر تهیه و

بر روی برگ‌های نهال یک‌ساله‌ی کیوی رقم هایوارد مه پاشی شد. پاشش تا زمان جاری شدن سوسپانسیون از سطح برگ ادامه یافت. نهال‌ها در شرایط گلخانه با رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری و به مدت یک ماه موردبررسی روزانه قرار گرفتند. پس از مشاهده‌ی هر نوع علائم در همه روش‌های بیماری‌زایی، بازیابی مجدد باکتری‌ها، با کشت روی محیط آگار غذایی و شناسایی مقدماتی باکتری‌های جداسازی شده انجام شد (Everett et al., 2011).

## بررسی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

بررسی تولید رنگ‌دانه‌ی فلورسنت روی محیط کشت King's B، گروه آزمون‌های LOPAT و GATTA و برخی آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی مربوط به جنس *Pseudomonas* انجام شد (Schaad et al., 2001). بررسی توان رشد باکتری‌ها در شرایط هوازی یا بی‌هوازی (Hugh & Leifson, 1953) و آزمون استفاده از منابع مختلف کربن و نیتروژن در محیط پایه‌ی آیر انجام شد (Schaad et al., 2001). جهت بررسی و مقایسه در تمامی آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی از جدایه‌های بیماری‌زای *P. syringae* pv. *syringe* و *P. viridiflava*، *P. syringae* pv. *actinidiae* به‌عنوان جدایه‌های مرجع ذکر شده در جدول ۱ استفاده گردید.

شناسایی آن‌ها به کمک آغازگرهای اختصاصی میسر نبود، تکثیر و توالی‌یابی شد. برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت چهار دقیقه و سپس ۳۰ چرخه متشکل از واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس و اتصال در دمای ۵۲ درجه‌ی سلسیوس هر کدام به مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت هفت دقیقه تنظیم شد (Parkinson *et al.*, 2011). تعیین ترادف توالی‌های تکثیرشده به روش سنگر<sup>۶</sup> انجام شد و بررسی مشابهت توالی‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)<sup>۷</sup> و با استفاده از برنامه BLAST صورت گرفت. توالی تمامی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش در جدول شماره ۲ مشهود می‌باشد.

### نتایج

بررسی باغات و نمونه برداری از ۶۰ منطقه مختلف در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، نشانگر وجود چهار نوع مختلف علائم لکه برگ بود. این علائم شامل لکه زاویه‌ای قهوه‌ای‌رنگ بدون هاله، لکه‌ی سفید با حاشیه‌ی قهوه‌ای، لکه‌های نارنجی آجری رنگ و لکه‌ی آسوخته با هاله‌ی زردرنگ در اطراف آن، بود. در بین علائم مشاهده شده، آسوخته‌ی یا هاله‌ی زردرنگ در بیشتر باغات وجود داشت (تصویر ۱).

این علائم اغلب از حاشیه‌ی برگ، آشکار شده و به مرور کل پهنک را فراگرفته تا جایی که برگ کاملاً خشک شده و می‌ریزد. در روند جداسازی، بیش از ۴۰۰ ایزوله‌ی ناهمگن باکتریایی به دست آمد که از نظر شکل و رنگ در ۱۴ دسته‌ی مختلف قرار گرفتند. از میان آن‌ها، جدایه‌هایی به رنگ سفید نباتی، کرم شیشه‌ای و کرم مایل به زرد از تمامی مناطق مورد نمونه برداری با علائم لکه‌های آسوخته‌ی دارای هاله‌ی زردرنگ، جداسازی شد و از این بین ۲۵ عدد از جدایه

### شناسایی مولکولی جدایه‌های *Pseudomonas* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

اسیدنوکلئیک جدایه‌های بیماری‌زا به روش معمول فنل-کلروفرم، با اندکی تغییر استخراج گردید. به منظور تشخیص باکتری‌های جنس *Pseudomonas* از جفت آغازگر Ps-For, Ps-Rev با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۹۹۰ جفت بازی در سودوموناس‌ها استفاده شد (Widmer *et al.*, 1998). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای ذکر شده و مخلوط واکنش آماده<sup>۴</sup> محصول شرکت آمپلیکون<sup>۵</sup>، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده و با دمای اتصال ۶۸ درجه‌ی سلسیوس انجام شد.

### تشخیص مولکولی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

به منظور تشخیص *P. syringae* از میان جدایه‌ها، از آغازگر اختصاصی Psy-F, Psy-R با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۱۴۴ جفت بازی استفاده شد. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مشابه با شرایط ذکر شده در بند قبلی بود (Borschinger *et al.*, 2016).

### ردیابی مولکولی پاتووار *P. syringae* pv. *actinidia* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

به منظور تشخیص مولکولی پاتووار *P. syringae* pv. *actinidia* از میان جدایه‌های گونه‌ی *P. syringae*، از دو جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی rRNA 16S-23S (ITS) به نام PsaF1/R2 با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۲۸۰ جفت بازی و آغازگر PsaF3/R4 با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۱۷۵ جفت بازی استفاده گردید (Rees-George J. *et al.*, 2010). واکنش در دمای اتصال ۶۵ درجه‌ی سلسیوس انجام شد.

### تکثیر و تعیین ترادف ژن *rpoD*

بخشی از ژن *rpoD* در تعدادی از جدایه‌ها که

های مذکور با توجه به شکل و رنگ کلنی مشکوک به جنس *Pseudomonas* ارزیابی گردید و مورد بررسی های دقیق تر قرار گرفت. لازم به ذکر است که جدایه- های منتخب همگی از علائم لکه‌های آبسوخته با هاله- ی زردرنگ جداسازی گردید (تصویر ۱).

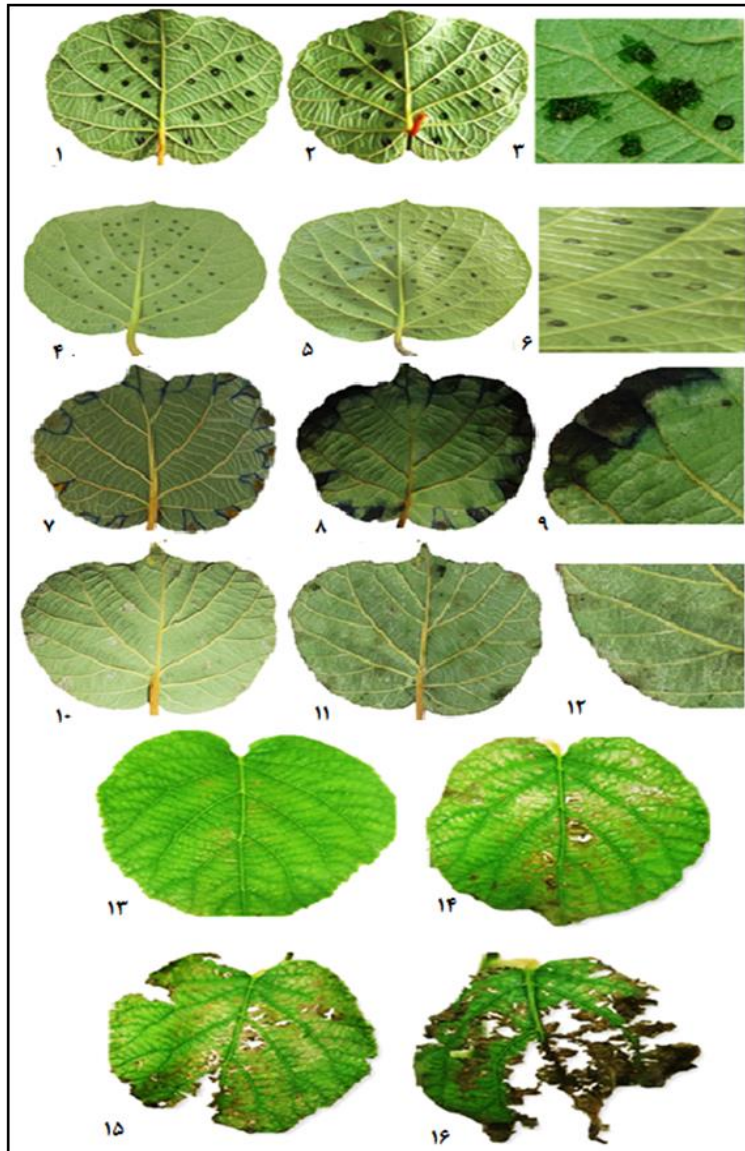
جدول ۲: آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

منبع	طول قطعه تکثیر شونده (جفت باز)	آغازگر	آغازگر
Widmer <i>et al.</i> , 1998	۹۹۰	GGTCTGAGAGGATGATCAGT	Ps-for
		TTAGCTCCACCTCGCGGC	Ps-rev
Guilbaud <i>et al.</i> , 2016	۱۴۴	ATG ATC GGA GCG GAC AAG	Psy F
		GCT CTT GAG GCA AGC ACT	Psy_R
Rees-George J. <i>et al.</i> , 2010	۲۸۰	TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT	psaf1
		CACGCACCCTTCAATCAGGATG	psaf2
Rees-George J. <i>et al.</i> , 2010	۱۷۵	ACCTGGTGAAGTTGGTCAGAGC	psaf3
		CGCACCTTCAATCAGGATG	psaf4
Parkinson <i>et al.</i> , 2011	۷۰۰	TGAAGGCGARATCGAAATCGCCAA	PsrpoD FNP1 (rpoD)
		YGCMGWCAGCTTYTGCTGGCA	PsrpoD nprpcr1 (rpoD)

### آزمون بیماری‌زایی

سه تا چهار روز پس از مایه‌زنی باکتری بر روی برگ‌های بریده‌شده، لکه‌های آبسوخته در محل تزریق ظاهر گردید. آبسوختگی به‌وضوح گسترش یافته و علائم به‌تدریج به رنگ قهوه‌ای تیره درآمد. در چند مورد نیز اطراف لکه‌های آبسوخته هاله‌ی زردرنگ مشاهده گردید (تصویر ۲). در سنجش توان بیماری‌زایی به روش مایه‌زنی بیمارگر به برگ کیوی بریده‌شده از قسمت حاشیه‌ی برگ، شروع علائم بسیار سریع‌تر بود به گونه‌ای که در کمتر از ۴۸ ساعت علائم آبسوختگی ظاهر گردیده و پیشروی نمود. در این بررسی در محل مایه‌زنی برخی از باکتری‌ها شیرابه قرمز رنگ ترشح گردید. در بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی نهال، در برخی موارد لکه‌های قهوه‌ای آبسوخته از حاشیه‌ی برگ شروع شده، به وسط برگ راه یافت و به‌مرور پیشروی کرده تا کل برگ را

فراگرفته و خشک نمود. همچنین در چند مورد آبسوختگی به دم برگ و ساقه پیشروی نمود و در نهایت به سبب شدت آلودگی کل نهال فاقد برگ گردید (تصویر ۲). در هیچ‌کدام از روش‌های مذکور جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* و *Xanthomonas Pseudomonas viridiflava* *translucens* pv. *translucens* جدایه‌ی ساپروفیت استفاده‌شده به‌عنوان جدایه‌های شاهد، علائم آبسوختگی یا نکروز بر روی برگ از خود نشان ندادند. در تمامی موارد، مایه‌زنی با آب مقطر استریل نیز هیچ‌گونه علائمی ایجاد نکرد. در تمام مواردی که بر روی برگ علائمی دال بر بیماری‌زایی مشاهده گردید، جمعیت بالایی از باکتری از بافت مایه‌زنی شده جداسازی و پس از سنجش مقدماتی، تشابه کامل با باکتری مایه‌زنی شده داشت.



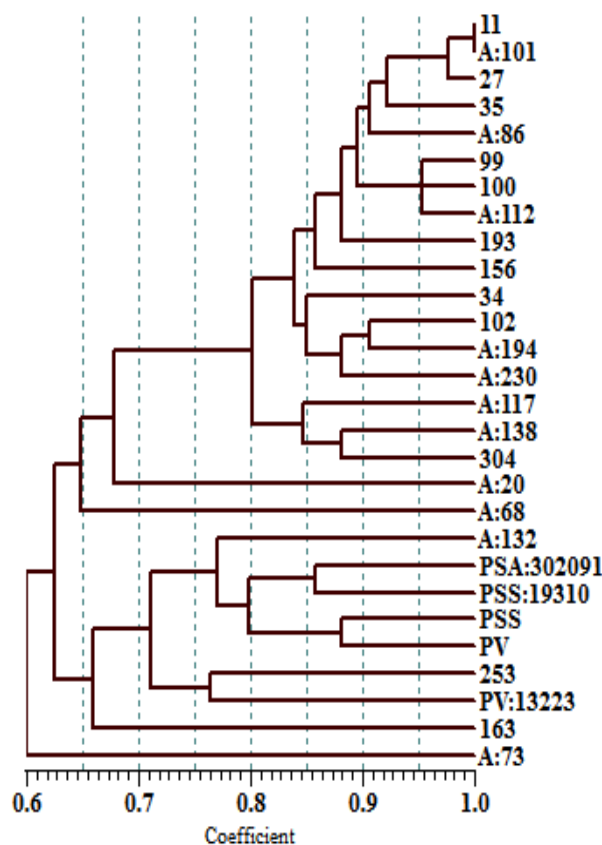
تصویر ۲: آزمون بیماری‌زایی  
شماره‌های ۱ الی ۶: مربوط به مایه‌زنی

جدایه‌های باکتریایی به برگ جداشده کیوی. ۱: برگ مایه‌زنی شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز اول. ۲: برگ مایه‌زنی شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز سوم و ایجاد و پیشروی علائم آب‌سوختگی. ۳: علائم آب‌سوختگی از نمای نزدیک. ۴: برگ مایه‌زنی شده با باکتری غیر بیمارگر کیوی در روز هفتم و عدم ایجاد آب‌سوختگی. ۵: برگ مایه‌زنی شده با باکتری غیر بیمارگر کیوی در روز هفتم و عدم ایجاد آب‌سوختگی. ۶: عدم ایجاد آب‌سوختگی از نمای نزدیک. شماره‌های ۷ الی ۱۲: مربوط به مایه‌زنی جدایه‌های باکتریایی به حاشیه‌ی برگ جداشده کیوی. ۷: برگ مایه‌زنی شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز اول. ۸: برگ مایه‌زنی شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز سوم و ایجاد و پیشروی علائم آب‌سوختگی. ۹: علائم آب‌سوختگی از نمای نزدیک. ۱۰: برگ مایه‌زنی شده با باکتری غیر بیمارگر کیوی در روز اول. ۱۱: برگ مایه‌زنی شده با باکتری غیر بیمارگر کیوی در روز هفتم و عدم ایجاد آب‌سوختگی. ۱۲: عدم ایجاد آب‌سوختگی از نزدیک شماره‌های ۱۳ الی ۱۶: مربوط به مایه‌زنی بیمارگر به برگ نهال کیوی. ۱۳: برگ مه‌پاش شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز اول. ۱۴: برگ مه‌پاش شده با جدایه‌ی بیمارگر در روز هفتم ۱۵: ایجاد و پیشروی علائم در روز دهم. ۱۶: علائم آب‌سوختگی برگ در روز بیستم

## ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

از میان ۱۳۰ جدایه که در بررسی آزمون بیماری‌زایی، توان ایجاد یا بروز علائم را داشتند ۲۵ جدایه انتخاب شد که این جدایه‌ها از نظر شکل و مورفولوژی به صورت کلنی‌های کرم رنگ یا شیری رنگ و لعاب دار و براق بوده و برخی از آن‌ها توانایی تشکیل رنگدانه‌ی فلورسنت بر روی محیط کشت King's B را نیز داشته و بیشترین احتمال شباهت با سدوموناس‌ها را در بین سایر کلنی‌های موجود به صورت تقریبی دارا بودند. سپس جدایه‌های منتخب توسط بررسی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید تعدادی از جدایه‌ها از جمله جدایه‌های ۱۹۴، ۱۳۲، ۱۳۸، ۸۶، ۲۰ و ۲۳۰ که در

آزمونهای بعدی نیز به عنوان پاتووار *P. syringae* pv. *actinidia* شناسایی شدند، فاقد توانایی ایجاد رنگ‌دانه‌ی فلورسنت بر روی محیط King's B می‌باشند. این جدایه‌ها همگن نبوده و تفاوت‌هایی از نظر شکل پرگنه و برخی خصوصیات دیگر داشتند. در این بررسی‌ها جدایه‌ها در لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی، منفی و در ایجاد فوق حساسیت در توتون مثبت و در سایر آزمون‌های بیوشیمیایی مانند توانایی استفاده از منابع کربنی متغیر ارزیابی گردیدند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از این آزمون‌ها نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه در سطح تشابه ۸۵ درصد در ۱۲ خوشه فنوتیپی متمایز قرار می‌گیرند (تصویر ۳).



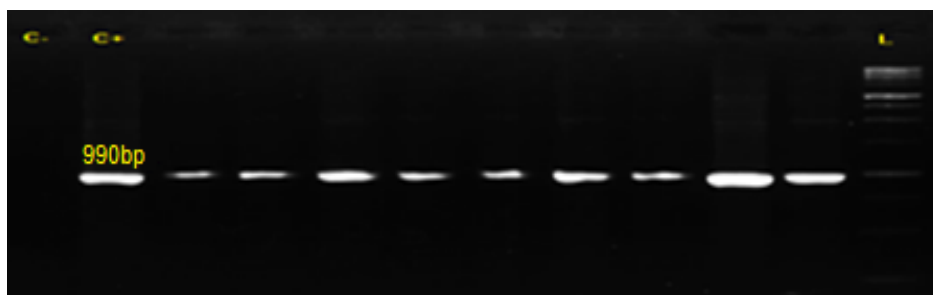
شکل ۳: دندروگرام ترسیم شده بر اساس خصوصیات فنوتیپی. با ضریب تشابه هشتاد و پنج درصد. PSA: *P. syringae* pv. *actinidia* کد PSS: *P. syringae* pv. *actinidia*، کدهای دارای حرف A: جدایه‌های مورد بررسی که توسط یک یا هر دو آغازگر اختصاصی *P. syringae* pv. *actinidia* به نام‌های PsaF1/R2 یا PsaF3/R4 به عنوان پاتووار *P. syringae* pv. *actinidia* شناسایی شده‌اند. کدهای فاقد حرف A: جدایه‌های مورد بررسی که توسط هیچ کدام از آغازگرهای اختصاصی *P. syringae* pv. *actinidia* به نام PsaF1/R2 یا PsaF3/R4، به عنوان پاتووار *P. syringae* pv. *actinidia* مشخص نشدند.



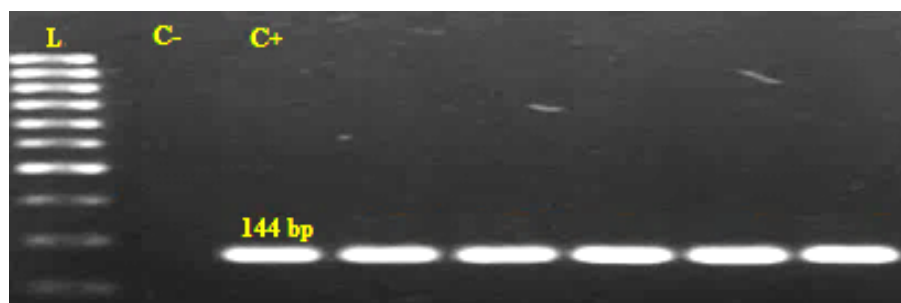
### بررسی‌های مولکولی

کاربرد آغازگر اختصاصی Ps-For, Ps-Rev شده بر اساس ژن حفاظت شده 16S rRNA سدوموناس‌ها، در ۲۰ جدایه از میان جدایه‌های منتخب سبب تکثیر قطعه‌ی ۹۹۰ جفت بازی گردید و بدین ترتیب تعلق این جدایه‌ها به جنس *Pseudomonas* محرز شد (تصویر ۴). همچنین آغازگرهای Psy-R و Psy-F طراحی شده بر اساس نواحی ۱۶۶ جفت بازی در همسایگی دو ژن کد کننده فسفولیپید اسیدهای چرب به نام *plsX* و ژن کد کننده پروتئین ریبوزومی L32 به نام *rpmF* سبب تکثیر قطعه‌ی ۱۴۴ جفت بازی در ۱۴ جدایه از میان جدایه‌های متعلق به جنس *Pseudomonas* گردید. در نتیجه این جدایه‌ها در گونه‌ی *P. syringae* قرار گرفتند (تصویر ۵). در ردیابی مولکولی پاتووار *P. syringae* pv. *actinidiae* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Psaf3/R4 و Psaf1/R2، طرحی شده بر

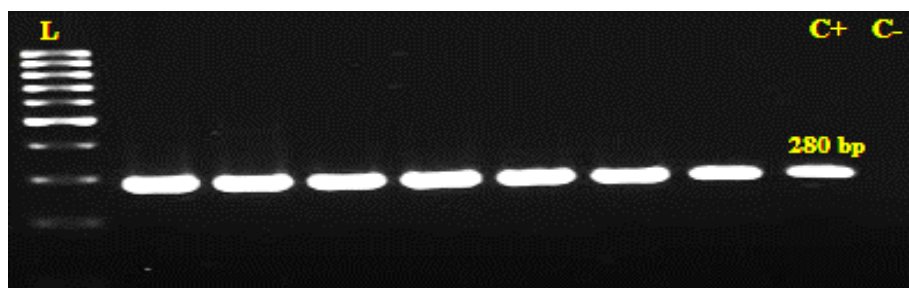
اساس توالی 16S-23S rRNA (ITS)، هشت جدایه به‌عنوان پاتووار *P. syringae* pv. *actinidiae* شناسایی گردید در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز تک‌<sup>ا</sup> در این جدایه‌ها به ترتیب توالی ۲۸۰ جفت بازی و ۱۷۵ جفت بازی توسط آغازگرهای مذکور به‌خوبی تکثیر شد (تصویر ۷ و ۶). تعیین ترادف ژن *rpoD* و بررسی میزان مشابهت توالی ژن‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی در ۶ جدایه باقی‌مانده با استفاده از برنامه BLAST نشان داد که این جدایه‌ها از جنس *Pseudomonas* بوده ولی با هیچ‌کدام از سدوموناس‌های بیمارگر گیاهی ثبت‌شده در بانک ژن درصد شباهت قابل استنادی نداشته و شناسایی دقیق‌تر آن‌ها مستلزم انجام آزمون‌های مولکولی دقیق‌تر مانند آنالیز توالی چندژنی می‌باشد.



تصویر ۴: قطعه‌ی ۹۹۰ جفت بازی تکثیرشده در ۲۵ جدایه‌بیماری‌زای منتخب و مشکوک به *Pseudomonas* - توسط آغازگر اختصاصی Ps-For, Ps-Rev. c+: کنترل مثبت *P. syringae* pv. *actinidiae*. C-: کنترل منفی (مخلوط واکنش فاقد DNA). L: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی.



تصویر ۵: قطعه ۱۴۴ جفت بازی تکثیرشده توسط آغازگر اختصاصی Psy-R و Psy-F در تعدادی از جدایه‌های شناسایی شده به‌عنوان *Pseudomonas*. c+: کنترل مثبت *P. syringae* pv. *actinidiae*. C-: کنترل منفی (مخلوط واکنش فاقد DNA). L: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی.



تصویر ۶: قطعه‌ی ۲۸۰ جفت بازی تکثیر شده توسط آغازگر اختصاصی PsaF1/R2 در تعدادی از جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *P. syringae* pv. *actinidiae*. L: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی



تصویر ۷: قطعه‌ی ۱۷۵ جفت بازی تکثیر شده توسط آغازگر اختصاصی PsaF3/R4 در تعدادی از جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *P. syringae* pv. *actinidiae*. L: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

گیاهان از جمله درختان میوه، سبزیجات و گیاهان زینتی را آلوده نماید. در گیاهان چوبی علائمی از جمله پژمردگی گل‌ها، مرگ جوانه‌ها، لکه برگی نکروتیک، لکه روی میوه‌ها، شانکر ساقه، خشکیدگی سرشاخه ایجاد نموده (Moore, 2008) و همچنین توانایی ایجاد لکه باکتریایی، لکه قهوه‌ای و بلایت هاله‌ای را دارا می‌باشد. در این بررسی علائم مختلف و متنوع کله برگی از جمله لکه زاویه‌ای قهوه‌ای رنگ بدون هاله، لکه‌ی سفید با حاشیه‌ی قهوه‌ای، لکه‌های نارنجی آجری رنگ و لکه‌های آسوخته با هاله‌ی زرد رنگ در اطراف آن، بر روی برگ‌های کیوی مشاهده گردید که در بین آن‌ها علائم آسوخته با هاله‌ی زرد رنگ در بسیاری از باغات دیده شد. در بررسی‌های اولیه، این علائم بسیار شبیه علائم دیده‌شده ایجادشده توسط یکی از پاتووارهای *P. syringae* به نام *P. syringae* pv. *actinidiae* در باغات نیوزلند (Everett et al., 2011) و ایتالیا (Balestra et al., 2009)، ارزیابی گردید که این امر لزوم بررسی بیشتر برای یافتن عامل

## بحث

با توجه به سهم قابل قبول کشور در بازار جهانی تولید کیوی، توجه به آفات و بیماری‌های تهدیدکننده‌ی آن، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. از میان عوامل بیماری‌گر باکتریایی مهم تهدیدکننده‌ی این گیاه می‌توان به گونه‌های مختلف باکتری از جنس *Pseudomonas* اشاره نمود. جنس *Pseudomonas* از جمله باکتری‌های گرم منفی بوده که متنوع‌ترین باکتری‌های گیاهی و بیشترین تعداد گونه را در برمی‌گیرد (Gomila et al., 2015). یکی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس، باکتری بیماری‌گر گیاهی *P. syringae* می‌باشد که گونه‌های متعددی از گیاهان را آلوده می‌کند. شواهد زیادی مبتنی بر اختصاص یافتگی میزبانی در جدایه‌های *P. syringae* وجود دارد به طوری که مجموعه *syringae* شامل ۱۵ گونه سودوموناس و ۶۴ پاتووار از *P. syringae* می‌باشد (Gomila, et al., 2017) از ویژگی‌های مهم این پاتوژن دامنه بیماری‌گری آن است که می‌تواند طیف وسیعی از

*Bacillus pv. translucens* بیمارگر جو و جدایه‌های *Pseudomonas chlororaphis* و *subtilis* در هیچ‌کدام از روش‌های مذکور علائمی از خود نشان ندادند که این امر صحت آزمون بیماری‌زایی را نشان می‌دهد به‌گونه‌ای که در صورت مطلوب شدن شرایط برای ایجاد بیماری این قابلیت را دارند که درخت را به مرز نابودی برسانند.

شناسایی دقیق این عوامل و آگاهی از مکانیسم ایجاد بیماری توسط آن‌ها برای پیشگیری از وقوع فاجعه‌ی اپیدمی بسیاری ضروری می‌باشد. تشخیص و شناسایی گونه و پاتووارهای سودوموناس به روش‌های مختلف فنوتیپی و مولکولی صورت می‌گیرد. به‌طور کلی ۱۵ آزمون معین برای افتراق سودوموناس‌های بیماری‌زای گیاهی *Pseudomonas spp* استفاده می‌شود که در این بین آزمون‌های متداول در تشخیص گونه‌های سودوموناس می‌توان به آزمون‌های سری LOPAT و GATTA (Latorre & Jones, 1979) اشاره نمود؛ اما از آنجاکه آزمون‌های فنوتیپی به‌تنهایی کافی نبوده و قدرت تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر را ندارند، Guilbaud *et al.*, 2016) لذا انجام آزمون‌های مولکولی اجتناب‌ناپذیر است.

در بین روش‌های مولکولی موجود برای تشخیص، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز خصوصاً از نوع ساده با یک جفت آغازگر، به‌عنوان یک فن قابل اعتماد، با حساسیت بالا و دقت کافی می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب در جهت تشخیص به‌موقع و شناسایی دقیق بیمارگرها مورد استفاده قرار گیرد. در این روش استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی‌های نیمه حفاظت‌شده در ژنوم باکتری‌ها بسیار کارآمد می‌باشد. برای این منظور می‌توان از آغازگر Psy که به منظور ردیابی سریع باکتری‌های متعلق به گونه *P. syringae* طراحی شده است برای تشخیص، تعلق باکتری به این گونه استفاده نمود (Guilbaud *et al.*, 2016). در این پژوهش با استفاده از این جفت آغازگر اختصاصی مشخص گردید که ۲۰ جدایه از بین ۲۵ جدایه‌ی بیماری‌زای منتخب، به گونه *P. syringae* تعلق دارند. همچنین سازمان حفاظت از گیاهان اروپا و

یا عوامل ایجادکننده‌ی این علائم را رقم زد. از آنجا که باکتری *P. syringae* توانایی استقرار به‌صورت فاز رورست روی میزبان را دارا بوده و می‌تواند روی میزبان تکثیر کرده و زاد مایه لازم برای ایجاد بیماری در شرایط مساعد محیطی را فراهم نماید (Hirano & Upper, 2000) و همچنین می‌تواند در سطح گیاه به‌صورت اپی‌فیت بقا داشته باشد (Schaad *et al.*, 2001) همراهی باکتری با گیاه، دلیلی بر بیماری‌زایی آن نبوده و انجام آزمون‌های بیماری‌زایی دقیق و تکرارپذیر برای انتخاب جدایه‌های بیمارگر، بسیار ضروری است. هرچند القای واکنش فوق حساسیت نیز نشانه قابل اعتمادی از پتانسیل بیماری‌زایی باکتری می‌باشد. تمامی ۲۵ جدایه‌ی مورد بررسی در این پژوهش توانایی ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ‌های شمعدانی و گیاه توتون را دارا بودند. همچنین این ۲۵ جدایه در آزمون بیماری‌زایی، بر روی برگ بریده‌شده‌ی کیوی در آزمایشگاه با دو روش و سه تکرار و بر روی نهال در شرایط گلخانه بیماری‌زا ارزیابی گردیدند. در بررسی گلخانه‌ای بر روی نهال، علائم لکه برگ‌ی در برخی جدایه‌ها مانند جدایه‌ی شماره ۲۳۰ علائم از حاشیه شروع شده و به قسمت میانی برگ انتقال یافت. این اتفاق شاید به این دلیل است که باکتری می‌تواند از طرق مختلفی مثل روزنه‌های برگ، روزنه‌های آبی، عدسک‌ها و زخم ناشی از افتادن برگ‌ها به درون برگ نفوذ کند (Spinelli *et al.*, 2010). در برخی جدایه‌ها بیماری از برگ‌های مایه‌زنی شده به برگ‌های مایه‌زنی نشده نیز منتقل گردید که می‌تواند ناشی از قطرات حاصل از آبیاری پاششی یا برخورد مکانیکی برگ‌ها به هم باشد. در این موارد نیز بیماری در برگ‌های جدید شروع به پیشروی نمود. در برخی جدایه‌ها پیشروی علائم در دم برگ و قسمتی از ساقه نیز دیده شد و در نهایت نهال فاقد برگ گردید. این در حالی است که علی‌رغم فراهم شدن بستری غذایی و دمایی مناسب برای رشد باکتری‌ها، سایر باکتری‌های غیر مرتبط از جمله *P. syringae viridiflava* و *P. syringae syringae* بیمارگرهای مرکبات، *Xanthomonas translucens*

در گروه‌های نزدیک به هم مشاهده گردید و این امر تا حدودی مؤید صحت بررسی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی می‌باشد. در سال ۲۰۱۶ بیگی و همکاران طی مطالعه‌ای به منظور بررسی پاتوژن‌های بیمارگر مرکبات توانستند جدایه‌های بیمارگر را به کمک آزمون‌های فنوتیپی و تعیین ترادف بخشی از ژن *rpoD* در ۱۱ گروه مرتبط با سودوموناس‌های فلورسنت دسته‌بندی کنند (Beiki et al., 2016).

همچنین جدایه‌های شناسایی شده با آغازگر اختصاصی ویژه *P. syringae* pv. *actinidiae* تقریباً به صورت پراکنده در تمامی گروه‌های فنوتیپی مشاهده گردید و تنها یکی از این پاتووارها در گروه فنوتیپی حاوی جدایه‌ی استاندارد این پاتووار قرار گرفت و از خصوصیات فنوتیپی مشابهی با آنرا دارا بود. از آنجایی که تفاوت در بروز صفات فنوتیپی خصوصاً تفاوت در استفاده از منابع کربنی می‌تواند ناشی از تفاوت در ژنوم این پاتووارها باشد بررسی بیشتر و انجام بررسی‌های چندژنی الزامی می‌باشد. بررسی انجام‌شده در سال ۲۰۱۰ بر روی پاتووارهای *P. syringae* pv. *actinidiae* نشان داد که این جدایه‌ها همسان نیستند. در این مطالعه مشخص گردید که استرین جداسازی شده در سال ۲۰۰۸ با استرین‌هایی که در سال‌های قبل یافت شده بود متفاوت بوده و پس از انجام مقایسات توالی چند ژن در گروه‌های متفاوتی از سایر جدایه‌های دنیا قرار گرفت. الگوی اثرانگشتی به دست آمده از آزمون REP-PCR، نیز همین تفاوت‌ها را نمایش داد (Ferrante & Scortichini, 2010). خسارت پدید آمده در کشور ایتالیا به دلیل شیوع این بیماری در سال ۲۰۰۹-۲۰۰۸ برابر با دو میلیون یورو برآورد گردیده (Balestra et al., 2009a) و این زیان بسیار بیشتر از خسارت‌های سال‌های قبل بود. لذا بررسی تفاوت در جدایه‌های عامل بیماری در سال‌های مختلف اهمیت زیادی داشت. اگرچه بیشتر جدایه‌هایی که از منطقه‌ی بای آف پلنتی<sup>۱</sup> واقع در نیوزلند جداسازی شدند شبیه جدایه‌های یافت شده در ایتالیا بعد از سال ۲۰۰۸ می‌باشند اما بعضی از باکتری‌ها که

مدیرانه (EPPO) در دستورالعمل شماره PM 7/120 در مورد شیوه شناسایی و ردیابی پاتوار *P. syringae* pv. *actinidiae* به صورت سریع و دقیق روشی را ارائه داد که در آن روش برای ردیابی سریع این پاتوژن از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شده است (Stefani, Loreti, 2014). در این دستورالعمل تأیید شده، می‌توان به دو جفت آغازگر اختصاصی اشاره کرد که در سال ۲۰۱۰ به منظور تشخیص مولکولی پاتووار *P. syringae* pv. *actinidiae* از میان جدایه‌های گونه‌ی *P. syringae* بر اساس توالی 16S-23S rRNA (ITS) به نام Psaf1/R2 با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۲۸۰ جفت بازی و آغازگر Psaf3/R4 با قابلیت تکثیر قطعه‌ی ۱۷۵ جفت بازی طراحی شد و پس از سنجش اختصاصیت آن‌ها و کیفیت شناسایی در نهایت به عنوان آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی جدایه‌های حاصل از درخت کیوی معرفی گردید (Rees-George J. et al., 2010). از آن موقع تاکنون در تحقیقات مختلفی برای ردیابی این پاتوژن در کشورهای مختلف جهان نظیر نیوزلند (Everett et al., 2011)، ترکیه (Bastas & Karakaya, 2012) فرانسه (Cunty et al., 2014) و یونان (Holeva et al., 2015) از این جفت آغازگرها استفاده شده است. بالسترا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ برای اولین بار حضور این بیمارگر را در اسپانیا به کمک این آغازگرها مشاهده و اعلام نمودند (Balestra et al., 2011). ردیابی *P. syringae* pv. *actinidiae* از بین جدایه‌های متعلق به گونه‌ی *P. syringae* توسط جفت آغازگر اختصاصی مذکور در این پژوهش نیز تعلق ۸ جدایه از جدایه‌های بیمارگر کیوی در ایران را به این پاتووار نشان داد.

در تفسیر دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی و مقایسه‌ی آن با نتایج مولکولی در این پژوهش مشاهده گردید که جدایه‌های تعیین شده به عنوان *P. syringae* توسط آغازگرهای اختصاصی *Psy* در گروه‌های فنوتیپی متفاوتی قرار گرفت. به گونه‌ای که تنها برخی از جدایه‌ها در فاصله‌ی نزدیک با جدایه‌ها استاندارد قرار می‌گیرد. این در حالی است که جدایه‌های استاندارد

پژوهشی به منظور یافتن عامل بیماریگر مرکبات در ایران نیز پس از مطالعات چندژنی به گونه‌ی ناشناسی از سودوموناس‌ها برخورد کردند که با گونه‌های موجود شباهت قابل قبولی دارا نبود و تحت عنوان *Pseudomonas spp* از آن نام‌برده شد (Beiki et al., 2016) و با بررسی‌های تکمیلی گونه‌های جدید به‌عنوان عوامل بیماری‌زای بلاست مرکبات معرفی شدند (Beiki et al., 2016). این احتمال وجود دارد که در مورد بیماری لکه برگ کیوی نیز با گونه‌های ناشناس و جدیدی از سودوموناس‌ها مواجه باشیم. ضروری می‌باشد که جایگاه دقیق تاکسونومیکی تمامی جدایه‌ها به کمک بررسی‌های فنوتیپی و مولکولی به مراتب بیشتر از این پژوهش و با دقت تمام مشخص گردد. همچنین با توجه به نزدیک بودن باغات کیوی و باغات مرکبات در مناطق شمالی کشور ضروری است که دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های مذکور موردسنجش قرار گرفته و بررسی مکانیسم بیمار گری و شرایط مطلوب برای همه‌گیر شدن و افزایش خسارت این بیماری‌گرها بررسی گردد. این احتمال وجود دارد که پاتوژن‌های مشترکی برای این محصولات وجود داشته باشد. جهت بررسی‌های مذکور آزمایشات لازم طراحی و در دست اجرا می‌باشد.

از علائم لکه برگ در خارج از منطقه‌ی بای آف پلنتی جداسازی شده بوده و شناسایی شدند در توالی ژن *cts* و الگوی اثرانگشتی نیز تفاوت داشتند. لذا بررسی تفاوت‌های احتمالی میان جدایه‌های یافت شده در هر پژوهش، ضروری بوده و در ممانعت از همه‌گیری و انجام مطالعات مدیریتی حائز اهمیت فراوان است.

پاتووارهای مذکور در ایران از پراکندگی جغرافیای خاصی در مناطق کیوی خیز کشور برخوردار بود به‌طوری‌که تقریباً در تمامی استان‌های مورد نمونه‌برداری مشاهده گردید. این امر می‌تواند هشدار جدی برای مناطق کیوی خیز کشور باشد به‌گونه‌ای که تحت شرایط آب و هوایی خاص توانایی فراگیر شدن و تحمیل خسارت سنگین به باغات را دارا خواهد بود. تجربه کشور نیوزیلند نشان داده است در اوایل نوامبر ۲۰۱۰ تنها علائم مشاهده‌شده از باکتری *P. syringae* pv. *actinidiae* لکه برگ و پوسیدگی شکوفه‌ها بود (Everett et al., 2011) و بعداز آن با افزایش شیوع اپیدمی خسارت فراوانی به اقتصاد نیوزلند تحمیل گردید. با توجه به مستندات حاصل از این پژوهش نشانه‌هایی از حضور *P. syringae* pv. *actinidiae* در ایران محرز می‌گردد. از آنجا که بیکی و همکاران در

## REFERENCES

- Ahmady, k. (2018). Ministry of Agriculture jihad, Agricultural statistics, garden products, Deputy Director of Planning and Economic Information and Communication Technology Center, 3 (In Farsi).
- Balestra, G. M., & Varvaro, L. (1997). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *Journal of Phytopathology*, 145(8-9), 375-378.
- Balestra, G. M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., & Rossetti, A. (2009a). Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 34-36.
- Balestra, G. M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., & Rossetti, A. (2009b). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(2), 299-301.
- Balestra, G. M., Renzi, M., & Mazzaglia, A. (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. *New Disease Reports*, 24(10), 2044-0588.
- Bastas, K. K., & Karakaya, A. (2012). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant Disease*, 96(3), 452-452.
- Beiki, F., Busquets, A., Gomila, M., Rahimian, H., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2016). New *Pseudomonas spp.* are pathogenic to citrus. *PLoS One*, 11(2), e0148796.
- Beiki, F., Rahimian, H., Goltapeh, E. M., Shamsbakhsh, M., Barzgar, A., Bisbal, A. B., & Lalucat, J. (2012). Phenotypic and pathogenicity characteristics of the agents causing citrus blast disease in the northern provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43(2), 211-222.

9. Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J. F., ... & Morris, C. E. (2016). A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 714-723.
10. Chizari, A.H., & Abolhasani, S. (2012). Survey of Iran s comparative advantage export and prioritizing export target markets in kiwi. *Agricultural Economic and Development*, 19(76), 83-120.
11. Cuntty, A., F. Poliakoff, C. Rivoal, S. Cesbron, M. Fischer-Le Saux, C. Lemaire, M. A. Jacques, C. Manceau, and J. L. Vanneste. (2014). Characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of strains Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, 64, 582–596.
12. Everett, K. R., & Henshall, W. R. (1994). Epidemiology and population ecology of kiwifruit blossom blight. *Plant Pathology*, 43(5), 824-830.
13. Everett, K. R., Taylor, R. K., Romberg, M. K., Rees-George, J., Fullerton, R. A., Vanneste, J. L., & Manning, M. A. (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 6(1), 67-71.
14. Ferrante, P., & Scortichini, M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology*, 59(5), 954-962.
15. Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., & Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2422.
16. Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 214.
17. , 6, 214.
18. Guilbaud, C., Morris, C. E., Barakat, M., Ortet, P., & Berge, O. (2016). Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(1).
19. Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 624-653.
20. Holeva, M. C., Glynos, P. E., & Karafra, C. D. (2015). First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Greece. *Plant Disease*, 99(5), 723-723.
21. Hugh, R., & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66(1), 24.
22. Latorre, B. A., & Jones, A. L. (1979). *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology*, 69(4), 335-339.
23. Mazarei, M., & Mostofipour, P. (1994). First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology*, 43(6), 1055-1056.
24. Moore, L. (2008). Diseases Caused by *Pseudomonas syringae*. Oregon State University, USA.
25. Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., & Elphinstone, J. (2011). Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathology*, 60(2), 338-344.
26. Rees-George, J., Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Pushparajah, I. P. S., Yu, J., Templeton, M. D., & Everett, K. R. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 59(3), 453-464.
27. Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
28. Scortichini, M. (1994). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, 43(6), 1035-1038.
29. Spinelli, F., Donati, I., Vanneste, J. L., Costa, M., & Costa, G. (2010, September). Real time monitoring of the interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* species. In *VII International Symposium on Kiwifruit 913* (pp. 461-465).
30. Stefani, E., & Loreti, S. (2014). PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.
31. Varvaro, L., Magro, P., & Mainolfi, P. (1990). Occurrence of *Pseudomonas viridiflava* in *Actinidia deliciosa* in Italy. *Informatore fitopatologico*, 40(6), 49-53.

32. Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S., & 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(7), 2545-2553.