مقایسهٔ جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall از میزبان‌های مختلف از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، سرولوژیک و بیماری‌زایی

سیدمحسن تقوی و محمد ضیایی[۱]

چکیده

به منظور مقایسهٔ جدایه‌های Pseudomonas syringae pv. *syringae (Pss)* anomodue *s از غلات، مرکبات، درختان میوهٔ هسته‌دار و برخی علف‌های هرز از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی، طی سال‌های ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ در استان فارس، شهرستان‌های کرج، فریدن، الیگودرز و شهرکرد از گیاهان فوق نمونه‌برداری شد. از ۳۵۰ جدایه باکتری فلورسنت، ٤٧ جدایه که از لحاظ اکسیداز، توانایی ایجاد پوسیدگی نرم در سیب زمینی و هیدرولیز آرژنین منفی بوده ولی روی توتون، شمعدانی یا هر دو فوق حساسیت ایجاد نمودند، مقدمتاً به عنوان Pss انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام شد.*

بر اساس آزمون‌های **LOPAT** *(لوان، اکسیداز، له کردن سیب زمینی، هیدرولیز آرژنین و فوق حساسیت روی توتون) جدایه‌ها به دو گروه، و بر اساس آزمون‌های* ***GATTa*** *(هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، تیروزیناز و استفاده از تارتارات) به ۹ گروه تقسیم شدند. جدایه‌های میزبان‌های مختلف در آزمون‌های لیپاز، لسیتیناز، تولید سیرینگومایسین، تشکیل هستهٔ یخ، بیماری‌زایی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی و سرولوژی در آزمون نشت دوطرفه در آگار با هم متفاوت بودند.*

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas syringae* **pv.** *syringae (Pss)*، *درختان میوهٔ هسته‌دار، مرکبات، بیماری‌زایی، ویژگی‌های فنوتیپی*

---

۱. به ترتیب دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

مقدمه

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae (Pss)* تا کنون از میزبان‌های مختلفی مانند درختان میوهٔ هسته‌دار، مرکبات، گندم، ذرت، نیشکر و علف‌های هرز در نقاط مختلف دنیا جداسازی شده است. نام این باکتری اغلب با سه اصطلاح اپی‌فیت (Epiphyte)، پاتوژن (Pathogen) و هستهٔ یخ (Ice nucleus) همراه بوده، که نشان دهندهٔ اهمیت حضور *Pss* روی گیاهان میزبان است (۱٤). طی پژوهش‌های به عمل آمده در شمال ایالات متحده آمریکا، تقریباً تمامی ۹۵ گونهٔ گیاهان زراعی و وحشی مورد بررسی، بجز برخی گیاهان سوزنی برگ و برخی گیاهان خانوادهٔ شب‌بو، حاوی باکتری‌های اپی‌فیت، از جمله *Pss* بودند (٦). باکتری *Pss* علاوه بر شانکر باکتریایی درختان میوهٔ هسته‌دار، عامل بیماری‌های مهم دیگری همچون لکه قهوه‌ای لوبیا، بلاست مرکبات، لکه باکتریایی سورگوم و نوار قرمز نیشکر می‌باشد (۱۱، ۱٤ و ۲۲). این باکتری به عنوان پاتوژن از گندم، ذرت، ارزن، سیب، گلابی، چغندرقند، کیوی و شمار دیگری از گیاهان زراعی و علف‌های هرز نیز جداسازی شده است (۷، ۱۰ و ۱۹).

اهمیت ایجاد هستهٔ یخ توسط باکتری *Pss* برای بیماری‌شناسان گیاهی بدین علت است که در اثر سرمازدگی، خسارت مکانیکی به بافت‌های گیاهی وارد شده و بخش آسیب دیده محل مناسبی برای نفوذ باکتری‌های پاتوژن خواهد بود (۳). جدایه‌های *Pss* به دست آمده از میزبان‌های مختلف از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، بیماری‌زایی و سرولوژی تفاوت‌هایی با هم دارند (۲ و ۲٦)، به طوری که جدایه‌های گلابی، سیب، هلو، سورگوم و گردو روی غلاف لوبیا فقط نقاط نکروتیک ایجاد می‌کنند، ولی جدایه‌های لوبیا روی غلاف لوبیا به طور مشخص لکه‌های آب‌سوخته (Water-soaked) به وجود می‌آورند (۱۳). هم‌چنین، در مورد جدایه‌های لوبیا یک حالت تخصص میزبانی وجود دارد، چون فقط جدایه‌های لوبیا و Lima bean توانسته‌اند روی لوبیا علائم مشخص لکه قهوه‌ای ایجاد نمایند (۱۱). در ایران تا کنون باکتری مذکور از گیاهان مختلفی مانند نیشکر (۲۲)، درختان میوهٔ هسته‌دار (۳ و ٦) و گندم (۱ و ٤) جداسازی و گزارش شده است.

با توجه به وجود تفاوت جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف، پژوهش حاضر به منظور مقایسهٔ جدایه‌های *Pss* از غلات، مرکبات، درختان میوهٔ هسته‌دار و برخی علف‌های هرز، از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی در نقاط مختلف استان فارس و شهرستان‌های کرج، فریدن، الیگودرز و شهرکرد صورت گرفت. بخشی از نتایج این پژوهش قبلاً گزارش شده است (۵).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در فصول خنک و مرطوب سال (از بهمن‌ماه ۱۳۷۷ لغایت خردادماه ۱۳۷۸) از درختان میوهٔ هسته‌دار (هلو، بادام، زردآلو و گیلاس)، درختان مرکبات (لیمو، نارنج و پرتقال)، غلات (گندم، جو و ذرت) و برخی علف‌های هرز موجود در مزارع نمونه‌برداری گردید. از جوانه‌های خفته، شکوفه‌ها، برگ‌ها، شاخه‌های جوان و دارای علائم شانکر درختان میوهٔ هسته‌دار، برگ‌ها و شاخه‌های جوان مرکبات، برگ‌های گندم دارای علائم بیماری بلایت باکتریایی، برگ‌های ذرت و علف‌های هرز نیز نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌برداری در استان فارس (شیراز، سپیدان، مرودشت، سعادت‌شهر، خفر، نی‌ریز، استهبان، مهارلو، نقش رستم و سیدان)، و شهرستان‌های فریدن (اصفهان)، کرج (تهران)، الیگودرز (لرستان) و شهرکرد (چهارمحال و بختیاری) انجام شد.

جداسازی باکتری

شاخه‌های آلوده به شانکر نخست با آب شسته شده، سپس با هیپوکلریت سدیم (محلول ۱۰ درصد از نوع تجاری موجود در بازار) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید. پس از له نمودن قطعاتی از بافت آلوده درون آب مقطر سترون، یک لوپ از سوسپانسیون به دست آمده روی محیط آگار غذایی یا NA

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

(Nutrient Agar) مخطط و به مدت ۲-٤ روز در دمای ۲۵°C قرار گرفت. تک‌کلنی‌های ظاهر شده روی محیط NA به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت King-B کشت داده شد (۱۵). پس از ۲-۵ روز کلنی‌های مولد رنگدانهٔ فلورسنت انتخاب و به دو میلی‌لیتر آب مقطر سترون انتقال یافت (۸).

برگ‌های گندم آلوده نیز پس از شست‌شو با آب جاری به مدت سه دقیقه درون هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی گردید، و دو مرتبه با آب مقطر سترون آب‌کشی شد. بقیه مراحل جداسازی برابر روش فوق انجام شد. برگ‌ها و شاخه‌های جوان، سالم و بدون علائم مرکبات، جوانه‌ها و شکوفه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، برگ‌های ذرت و علف‌های هرز نخست به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم، و درون پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. از عصارهٔ هر نمونه یک لوپ روی محیط آگار غذایی مخطط گردید، و بقیه مراحل مطابق روش فوق انجام شد. یک جدایهٔ *Pss* از آمریکا (اهدایی دکتر آزاد به شماره 0682-8، دانشگاه کالیفرنیا در ریورساید) و یک جدایهٔ Pss از نیشکر مازندران (اهدایی دکتر رحیمیان، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه مازندران) به عنوان سویه‌های مرجع (Reference strains) در کلیه آزمون‌ها به کار رفت.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها

تولید رنگدانهٔ فلورسنت روی محیط کشت King-B (۱۵) و آزمون گرم بر اساس روش‌های ساسلو و همکاران (۲۵) و شاد (۲۳) انجام شد. آزمون‌های گروه LOPAT با روش لیلیوت و همکاران (۱۸) روی ۳۵۰ جدایه به دست آمده از میزبان‌های مختلف انجام شد. بر اساس نتایج آزمون‌های فوق، ٤۷ جدایه انتخاب و آزمون‌های دیگر فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی برای آنها انجام شد. برای تعیین واکنش فوق حساسیت جدایه‌ها، سوسپانسیونی با غلظت 1×10^{7} CFU (Colony forming unit) (تهیه شده به روش اسپکتروفتومتری) با سرنگ به زیر بشرهٔ برگ توتون (*Nicotiana tabacum* CV. Turkish) و شمعدانی (*Pelargonium zonale*) تزریق شد (۱٦). آزمون‌های کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته، رشد هوازی و بی‌هوازی (O/F)، لسیتیناز، رشد در ٤۱°C، تولید استویین، تشکیل هستهٔ یخ، هیدرولیز ژلاتین (ژلاتیناز) و تعیین تحرک باکتری (Motility) بر اساس روش فهی و پرسلی (۹) صورت گرفت. آزمون‌های احیای نیترات، هیدرولیز توین ۸۰ (لیپاز)، تولید ۳-کتولاکتوز، تولید ایندول، هیدرولیز کازیین، شیر لیتموس، تولید گاز H_2S از سیستئین، متیل‌رد (MR)، استفاده از قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه، واکنش جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها (آنتی‌بیوگرام)، تحمل نمک طعام و تولید سیرینگومایسین بر اساس روش شاد (۲۳) انجام شد. آزمون‌های دیگر با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام گرفت (۹ و ۲۳).

اثبات بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها از میوه‌های نارس گوجه فرنگی، نهال‌های ۲-۳ سالهٔ بادام و مرکبات، و گیاهان گندم و ذرت استفاده گردید. میوه‌های نارس گوجه فرنگی توسط هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی و با آب مقطر سترون آب‌کشی شد. برای هر جدایه سوسپانسیونی به غلظت 1×10^{6} CFU تهیه و هر میوه در سه نقطه با ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با سرنگ به زیر پوست میوه مایه‌زنی شد. هم‌چنین، روی هر میوه یک نقطه به عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی گردید. میوه‌ها درون پاکت‌های پلاستیکی حاوی مقداری پنبه مرطوب در دمای اتاق نگهداری شدند. پنج الی هفت روز بعد نتایج بر اساس میزان آب‌سوختگی و مرگ بافت (Necrosis) در محل تزریق ارزیابی گردید.

برای اثبات بیماری‌زایی روی گندم و ذرت، مقداری بذر گندم و ذرت در گلدان‌ها کشت گردید. برای هر جدایه سوسپانسیونی به غلظت 1×10^{6} CFU تهیه و در مرحله ٤-٦ برگی با مه‌پاش روی برگ‌های گیاهان فوق پاشیده شد. گلدان‌ها پس از مایه‌زنی برای ٤-۵ ساعت در پاکت‌های پلاستیکی

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

پوشانده شده، در شرایط گلخانه تا بروز علائم قرار گرفتند. در این آزمون از جدایه‌های غلات، مرکبات و درختان میوهٔ هسته‌دار هر کدام یک نماینده استفاده شد. یک گلدان از هر گیاه نیز با آب مقطر به عنوان شاهد مایه‌زنی گردید. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد (۲٤).

برای اثبات بیماری‌زایی از نهال‌های ۲-۳ سالهٔ بادام، پرتقال و نارنج، که در گلدان کاشته شده بود، استفاده گردید. برای کلیهٔ جدایه‌ها سوسپانسیونی به غلظت 1×10^{6} CFU تهیه، و از هر جدایه به یک نهال بادام (نمایندهٔ درختان میوه هسته‌دار) و یک نهال پرتقال یا نارنج (نمایندهٔ مرکبات) مایه‌زنی گردید. مایه‌زنی در سه نقطهٔ درخت شامل پهنک برگ (Leaf blade)، محل افتادن برگ (Leaf scars) و محل زخم ایجاد شده با چاقوی سترون انجام شد. نقاط مایه‌زنی شده در محل زخم و افتادن برگ با نوار پارافیلم (Parafilm) پوشانده شد. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده گردید. سه ماه پس از مایه‌زنی نتایج ارزیابی شد. پهنک برگ مرکبات با سرنگ مایه‌زنی و ۷-۱۰ روز بعد برگ‌ها برای مشاهدهٔ علائم ارزیابی گردیدند (۸).

آزمون ایمنی‌سنجی (سرولوژی)

برای تهیه ایمیونوژن سوسپانسیونی از کشت ۲٤ ساعته از جدایه‌های غلات، مرکبات و درختان میوهٔ هسته‌دار، هر کدام یک نماینده که بیشترین شباهت را از نظر ویژگی‌های فنوتیپی با *Pss* داشت، در محلول نمک طعام ۰/۸۵ درصد با غلظت 1×10^{8} CFU تهیه شد. برای تهیهٔ آنتی‌سرم از روش هامپتون و همکاران (۱۲) استفاده شد. در آزمون سرولوژی از ٤۷ جدایهٔ *Pss* از میزبان‌های مختلف، و نیز یک جدایه *P. viridiflava* و *P. fluorescence* در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار استفاده گردید (۱۲).

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

از کشت ۲٤ ساعته باکتری روی محیط آگار غذایی، سوسپانسیونی تهیه و غلظت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر و در چگالی نوری ۱ تنظیم گردید. الکتروفورز به روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و در قالب دو ژل (ژل جدا کنندهٔ ۱۰ درصد و ژل پایهٔ ۵ درصد) پلی‌آکریل‌آمید انجام و جدایه‌ها از نظر نقوش پروتئین‌های سلولی مقایسه شدند (۱۷). ژل برای رنگ‌آمیزی درون محلول متانول، آب و اسید استیک (۱:۵:۵) حاوی ۰/۱ درصد کوماسی بلو قرار داده شده، به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر تکان داده شد. رنگ‌بری به وسیله متانول، آب و اسید استیک به نسبت (۱:۵:۵) به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه انجام، و در نهایت ژل برای بررسی و مقایسه در اسید استیک ۷ درصد نگهداری و از ژل عکس‌برداری گردید (۱۷).

نتایج

جداسازی و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها

در مجموع بیش از ۳۵۰ جدایه باکتری فلورسنت از گیاهان آلوده به شانکر باکتریایی نظیر درختان بادام، زردآلو و هلو و بوته‌های گندم آلوده به بلایت برگی، سطح اندام‌های مختلف گیاهان سالم مانند درختان مرکبات، ذرت و علف هرز سلمه جداسازی گردید. تعداد ٤۷ جدایه که از نظر تولید اکسیداز، پوسیدگی نرم سیب زمینی و هیدرولیز آرژنین منفی بوده، ولی روی توتون، شمعدانی یا هر دو ایجاد واکنش فوق حساسیت نمودند، مقدماً به عنوان *Pss* انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام شد. از ٤۷ جدایه *Pss* به دست آمده، ۲۵ جدایه از درختان میوهٔ هسته‌دار، ۱۰ جدایه از غلات (شامل جدایهٔ نیشکر)، هفت جدایه از مرکبات، سه جدایه از خاک، یک جدایه از علف هرز سلمه و یک جدایه از گردو بود. یک جدایهٔ *Pss* از آمریکا (8-0682) و یک جدایهٔ *P. fluorescence* نیز در تمام آزمون‌ها به کار رفت.

همهٔ جدایه‌های مورد بررسی روی محیط کشت King-B رنگ‌دانهٔ فلورسنت تولید کرده، و روی برگ توتون، شمعدانی یا هر دو واکنش فوق حساسیت (HR) ایجاد نمودند. بر اساس واکنش به آزمون‌های گروه LOPAT، کلیهٔ جدایه‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه یک شامل ٤۵٪ از جدایه‌ها بود که

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

می‌توانستند لوان تولید کنند، و گروه دوم شامل ۵۵٪ جدایه‌ها بود که توانایی این کار را نداشتند. شصت و چهار درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار و ٤٠ درصد جدایه‌های غلات در گروه اول قرار گرفتند. گروه دوم شامل ٣٦ درصد از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ٦٠ درصد غلات، ١٠٠ درصد جدایه‌های مرکبات و خاک بود. جدایهٔ آمریکا در گروه اول و جدایهٔ نیشکر درگروه دوم قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله از آزمون‌های گروه GATTa (شامل آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، تیروزیناز و استفاده از تارتارات) جدایه‌های *Pss* به ٩ گروه تقسیم شدند (جدول ١): گروه ١. متشکل از جدایه‌های غلات (سه جدایه)، خاک (یک جدایه) و مرکبات (سه جدایه). گروه ٢. شامل جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار (١٥ جدایه)، غلات (دو جدایه) و مرکبات (سه جدایه). جدایهٔ آمریکا، جدایهٔ نیشکر و سلمه نیز در این گروه قرار گرفتند. گروه ٣. شامل جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار (چهار جدایه) و مرکبات (یک جدایه). گروه ٤. شامل جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار (دو جدایه). گروه ٥. شامل یک جدایه از درختان میوهٔ هسته‌دار. گروه ٦. شامل جدایه‌های غلات (دو جدایه). گروه ٧. شامل جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار (یک جدایه)، غلات (یک جدایه) و خاک (دو جدایه). گروه ٨. شامل یک جدایه از مرکبات. گروه ٩. شامل جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار (یک جدایه) و مرکبات (یک جدایه). ویژگی‌های دیگر جدایه‌ها در جدول ٢ آمده است.

واکنش جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

از میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، Ciprofloxacin، Amikacin، Tetracycline و Nalidixic acid روی تمام جدایه‌ها مؤثر بوده و از رشد آنها جلوگیری نمودند. در مقابل، Amoxicillin و Cloxacillin تقریباً روی هیچ‌کدام از جدایه‌ها تأثیر نداشته و نتوانستند از رشد آنها جلوگیری کنند.

بیماری‌زایی

از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار ٦٨ درصد، غلات ٦٠ درصد و مرکبات ٤٣ درصد روی میوه‌های نارس گوجه فرنگی بیماری ایجاد نمودند (شکل ١). در حالی که هیچ‌کدام از جدایه‌های خاک نتوانستند روی میوه‌های نارس گوجه فرنگی بیماری ایجاد کنند. در مایه‌زنی از طریق ایجاد زخم روی شاخهٔ بادام، ٣٦ درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار و ١٠ درصد جدایه‌های غلات شانکر ایجاد کردند (شکل ٢). جدایه‌های مرکبات، خاک و سلمه قادر به ایجاد شانکر روی شاخه‌های بادام نبودند. با مایه‌زنی در محل زخم برگ بادام، فقط جدایهٔ آمریکا و ٢٤ درصد از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار توانستند شانکر ایجاد نمایند، و بقیهٔ جدایه‌ها قادر به ایجاد شانکر نبودند. در مایه‌زنی از طریق ایجاد زخم روی شاخهٔ مرکبات، هیچ کدام از جدایه‌ها نتوانستند بیماری ایجاد نمایند. در مایه‌زنی پهنک برگ مرکبات، ٤٠ درصد از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ١٠ درصد جدایه‌های غلات و جدایهٔ آمریکا توانستند لکهٔ نکروتیک، که احتمالاً یک نوع واکنش فوق حساسیت می‌باشد، روی برگ ایجاد نمایند. با مایه‌زنی در محل زخم برگ مرکبات، فقط چهار درصد از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار بیماری ایجاد نمودند، و جدایه‌های دیگر قادر به ایجاد بیماری نبودند.

از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، غلات و مرکبات هر کدام یک نماینده انتخاب، و بیماری‌زایی آنها روی گندم و ذرت بررسی گردید. هر سه جدایه وقتی روی برگ گندم و ذرت پاشیده شدند، در گندم پس از دو هفته، و در ذرت پس از ٣-٤ هفته سوختگی شدید ایجاد کردند. سوختگی از نوک برگ آغاز شده و به طرف پایین برگ پیش‌روی می‌کرد.

سرولوژی

آزمون نشت دوطرفه در ژل آگار

تمام جدایه‌های مورد بررسی در برابر هر سه آنتی‌سرم تهیه شده قرار گرفتند. از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار ٩٢ درصد، غلات ٨٠ درصد، مرکبات ٨٦ درصد و جدایه‌های خاک ١٠٠ درصد با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ درختان میوهٔ هسته‌دار واکنش نشان دادند (شکل ٤). جدایه‌های سلمه، آمریکا

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

جدول ۱. گروه‌بندی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس واکنش به آزمون‌های گروه GATTa

گروه / آزمون	درصد جدایه‌ها	Ta	T	A	G
۱	۱۵	−	+	+	+
۲	٤۸	−	−	+	+
۳	۱۳	−	−	−	+
٤	٤	−	−	−	−
٥	۲	−	+	+	−
٦	٤	−	+	−	+
۷	۸	+	−	+	+
۸	۲	−	+	−	−
۹	٤	−	−	+	−

هیدرولیز ژلاتین (G: Gelatin hydrolysis) هیدرولیز آسکولین (A: Aesculin hydrolysis)
تایروزیناز (T: Tyrosinase activity) استفاده از تارتارات (Ta: Tartrate utilization)

جدول ۲. ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از میزبان‌های مختلف

آزمون / جدایه‌ها	A (۲٥)*	B (۱۰)	C (۷)	D (۳)	E (۱)	F (۱)
فلورسنت روی	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
اکسیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تولید لوان از سوکروز	۱٦	٤	۰	۰	۰	۱
له کردن سیب زمینی	۰	۰	۰	۰	۰	۰
هیدرولیز آرژنین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
فوق حساسیت روی توتون	۱۹	۷	٥	۰	۰	۱
شمعدانی	۲٤	۱۰	۷	۳	۱	۱
هیدرولیز اسکولین	۱۸	۸	٦	۳	۱	۱
تایروزیناز	۱	٥	٤	۱	۰	۰
مصرف تارتارات	۱	۱	۰	۲	۰	۰
کاتالاز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
مصرف بی‌هوازی گلوکز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مصرف هوازی گلوکز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
تولید H_2S از سیستئین	۲	۱	۱	۰	۰	۰
تحرک	۷	۳	٤	۳	۱	۰
هیدرولیز نشاسته	۰	۱	۰	۰	۰	۰
رشد روی نمک طعام ٥٪	۰	۰	٤	۰	۰	۱

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

ادامه جدول ۲.

جدایه‌ها / آزمون	A (۲۵)*	B (۱۰)	C (۷)	D (۳)	E (۱)	F (۱)
هیدرولیز توین ۸۰	۲	۱	٤	۲	۱	۰
لسیتیناز	۱	۲	٥	۳	۱	۰
رشد در ٤١°C	۰	۰	۰	۰	۰	۰
هیدرولیز کازیین	۲۳	۹	٥	۳	۱	۱
فسفاتاز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
متیل رد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
استویین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
احیای نیترات	۰	۰	۱	۰	۰	۰
اوره‌آز	۱۳	۲	٥	۰	۰	۱
۳-کتولاکتوز	۰	۰	۰	۰	۰	۰
واکنش روی شیر لیتموس (قلیایی)	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
مصرف سیترات	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
تولید ایندول	٤	۰	۱	۰	۰	۰
هیدرولیز ژلاتین	۲۱	۱۰	٥	۳	۱	۱
رنگ‌آمیزی گرم	۰	۰	۰	۰	۰	۰
واکنش گرم	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تشکیل هستهٔ یخ	۱۸	٥	۷	۱	۱	۱
تولید سیرینگومایسین	۱۲	۱۰	۳	۰	۱	۱
سوکروز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
زایلوز	۲٥	۹	٦	۳	۱	۱
لاکتوز	۱۰	۱	۳	۳	۰	۰
مانوز	۲٥	۹	۷	۳	۱	۱
رافینوز	۲۱	٥	٤	۳	۱	۱
آرابینوز	۲٥	۹	۷	۳	۱	۱
رامنوز	۲٤	٦	٦	۲	۱	۱
مالتوز	۱۰	۲	٤	۳	۰	۰
ملی‌بیوز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
تری‌هالوز	۱۰	٤	٦	۳	۰	۰
سلوبیوز	۲۳	۹	۷	۳	۱	۱
آرابیتول	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
مانیتول	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
سوربیتول	۲٥	۸	٥	۳	۱	۱
اینولین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گلوکز	۲٥	۹	۷	۳	۱	۱
گالاکتوز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
فروکتوز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱
دکستروز	۲٥	۱۰	۷	۳	۱	۱

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

ادامه جدول ۲.

جدایه‌ها / آزمون	A (۲۵)*	B (۱۰)	C (۷)	D (۳)	E (۱)	F (۱)
دالسیتول	۳	۲	۱	۰	۰	۰
اینوزیتول	۲۵	۹	۳	۳	۱	۱
اریتریتول	۲۳	۸	۳	۲	۱	۱
آدونیتول	۵	۱	۳	۰	۱	۰
گلیسرول	۲۵	۹	۷	۳	۱	۱
سالیسین	۸	۳	٤	۳	۱	۰
نشاسته	٤	۰	۲	۰	۱	۰
متیونین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
آسپاراژین	۲۵	۱۰	۷	۳	۱	۱
سیستئین	۷	۱	۲	۳	۱	۰
لاکتات	۲۵	۷	۷	۳	۱	۰
تارتارات	۲۲	٦	۱	۳	۰	۱
تارتارات	۳	۱	۰	۲	۰	۰
آرژنین	۲٤	۹	۵	۳	۱	۱
سوکسینات	۲۵	۹	۷	۳	۱	۱

A : جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار
B : جدایه‌های غلات
C : جدایه‌های مرکبات
D : جدایه‌های خاک
E : جدایه علف هرز سلمه
F : جدایه آمریکا
* : شمار جدایه‌های مورد آزمایش
** : شمار جدایه‌ها با واکنش مثبت

و گردو نیز با آنتی‌سرم فوق واکنش نشان دادند. جدایهٔ *P. viridiflava* با آنتی‌سرم فوق واکنش داد ولی جدایهٔ *P. fluorescence* با این آنتی‌سرم واکنش نشان نداد.

شصت درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، ۵۰ درصد غلات و ٤۳ درصد از جدایه‌های مرکبات با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ غلات واکنش نشان دادند (شکل ۵). جدایه‌های سلمه و آمریکا با آنتی‌سرم غلات واکنش نشان دادند، ولی جدایه‌های خاک، گردو، *P. viridiflava* و *P. fluorescence* با آنتی‌سرم غلات واکنش نشان ندادند. بیست و نه درصد جدایه‌های مرکبات، جدایهٔ آمریکا و *P. viridiflava* با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ مرکبات واکنش نشان ندادند. بیست و نه درصد جدایه‌های مرکبات، جدایهٔ آمریکا و *P. viridiflava* با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ مرکبات واکنش نشان دادند، ولی جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، غلات، خاک، گردو، سلمه و جدایهٔ *P. fluorescence* با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ مرکبات واکنش نشان ندادند. جدایهٔ نیشکر با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه نمایندهٔ جدایه‌های غلات و درختان میوهٔ هسته‌دار واکنش نشان داد، ولی با آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه نمایندهٔ جدایهٔ مرکبات واکنش نشان نداد.

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

از نظر نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی، جدایه‌های گیلاس کرج، زردآلوی کرج و بادام مهارلو تشابه زیادی با هم داشتند (بیش از ۹۰ درصد). جدایهٔ نیشکر با د یگر جدایه‌ها و جدایهٔ آمریکا تفاوت زیادی داشت، ولی با جدایهٔ زردآلوی باجگاه فقط در چند نوار سبک اختلاف داشتند. جدایهٔ سلمه در چند نوار پروتئینی با جدایه‌های بادام شهرکرد و زردآلوی باجگاه تفاوت داشت، ولی با جدایهٔ هلو از باجگاه شباهت

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

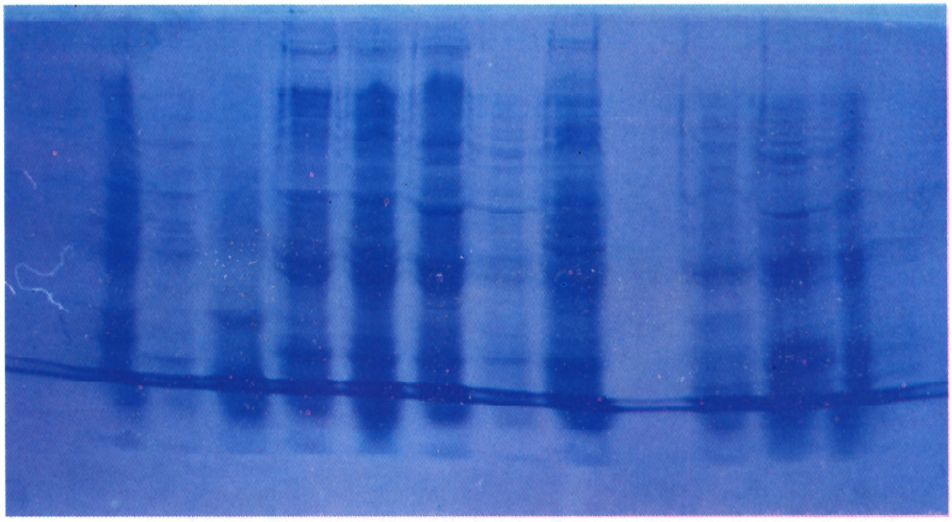
[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

شکل ۱. مایه‌زنی میوه‌های نارس گوجه فرنگی با جدایه‌های شماره ۲٤ (بادام) و ۳۱ (گندم) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
(گوجه فرنگی سمت راست مایه‌زنی شده با جدایهٔ غیر پاتوژن، شاهد منفی)

شکل ۲. ایجاد علائم شانکر در شاخه بادام در اثر مایه‌زنی با سوسپانسیون جدایهٔ ۲٤ (بادام) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

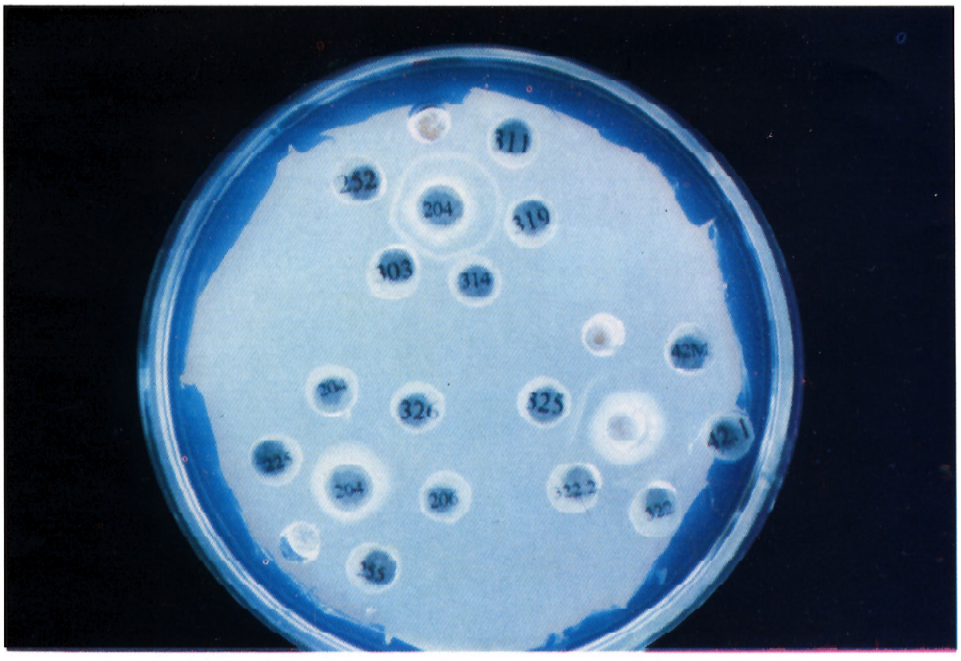
[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]



شکل ۳. مقایسهٔ نقوش الکتروفورز پروتئینی جدایه‌های ***Pseudomonas syringae*** **pv.** ***syringae*** از میزبان‌های مختلف

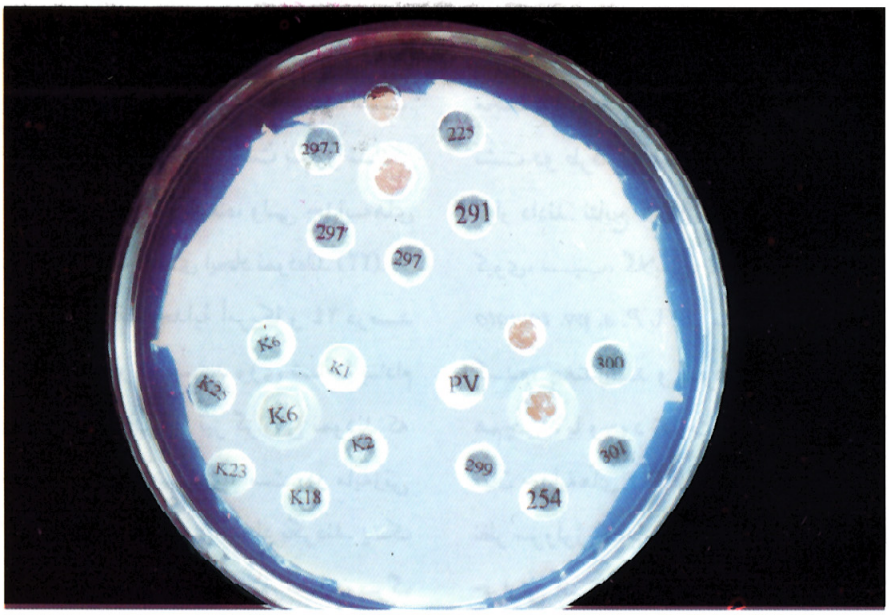
۱. جدایه ***Pss*** از آمریکا
۲. جدایه ***Pss*** هلو از باجگاه
۳. جدایه ***Pss*** زردآلو از فریدن
٤. جدایه ***Pss*** گیلاس از کرج
٥. جدایه ***Pss*** زردآلو از کرج
٦. جدایه ***Pss*** بادام از مهارلو
۷. جدایه ***Pss*** بادام از شهرکرد
۸. جدایه ***Pss*** مرکبات از شیراز
۹. شاهد (مخلوط B)
۱۰. جدایه ***Pss*** سلمه از سپیدان
۱۱. جدایه ***Pss*** از نیشکر
۱۲. جدایه ***Pss*** زردآلو از باجگاه



شکل ٤. واکنش سرولوژیک جدایه‌های ***P. syringae*** **pv.** ***syringae*** ۲۰٦، ۲۰۹، ۲٥٦، ۳۰۲، ۳۰۳، ۳۱۱، ۳۱٤، ۳۱۹ و ۳۲٦ از درختان میوه هسته‌دار و ۲۲٥ از غلات در برابر آنتی‌سرم تهیه شده علیه جدایهٔ درختان میوه هسته‌دار (۲۰٤)

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]



شکل ۵. واکنش سرولوژیک جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae*، K_2، K_{18}، K_{23}، K_1 و K_{25} (از درختان میوه هسته‌دار)، ۲۵۴، ۲۹۱، ۲۹۷، ۲۹۷/۱، ۲۹۹، ۳۰۰، ۳۰۱ و ۲۲۵ از غلات و Pv (*P. viridiflava*) در برابر آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ غلات (K_6)

زیادی داشت. جدایهٔ مرکبات نیز با جدایه‌های غلات و درختان میوهٔ هسته‌دار تفاوت داشت (شکل ۳).

بحث

در پژوهش حاضر کلیهٔ جدایه‌های *Pss* به دست آمده از درختان میوهٔ هسته‌دار، مرکبات، غلات، علف‌های هرز و خاک، روی محیط کشت King-B مولد رنگ‌دانهٔ فلورسنت بوده، روی برگ توتون، شمعدانی با هر دو واکنش فوق حساسیت ایجاد نمودند، ولی در آزمون‌های اکسیداز، هیدرولیز آرژنین و ایجاد پوسیدگی نرم روی سیب زمینی منفی بودند. بر اساس ویژگی‌های فوق و مشخصات کلی، جدایه‌های به دست آمده به عنوان *Pss* شناسایی گردید (۸ و ۲۱). بیشتر پژوهندگان ویژگی‌های اصلی *Pss* را تولید رنگ دانهٔ فلورسنت، واکنش فوق حساسیت روی توتون، منفی بودن آزمون‌های اکسیداز و هیدرولیز آرژنین می‌دانند (۸). ولی برخی دیگر عدم ایجاد پوسیدگی نرم روی سیب زمینی را نیز جزو ویژگی‌های اصلی این باکتری می‌دانند (۲۱).

آزمون‌های اثبات بیماری‌زایی به همراه بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی برای تشخیص بهتر جدایه‌های *Pss* لازم است، چون برخی جدایه‌ها به آزمون‌های گروه LOPAT واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. بر اساس نتایج آزمون‌های گروه GATTa، جدایه‌های *Pss* از میزبانهای مختلف در ۹ گروه تقسیم‌بندی گردید. گروه ۲ حدود ۴۷ درصد جدایه‌ها را در خود جای داد، که شامل شماری از جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، غلات، مرکبات، جدایهٔ آمریکا، جدایهٔ نیشکر و جدایهٔ سلمه بود. گروه‌بندی فوق با منشأ میزبانی هم‌بستگی نداشت، زیرا گروه‌های ۱، ۲، ۳، ۷ و ۹ جدایه‌هایی از میزبان‌های مختلف را در بر گرفته، و از سوی دیگر جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار در شش گروه، غلات در چهار گروه و مرکبات در پنج گروه توزیع شدند. گروه ۲ شامل بیشترین درصد جدایه‌ها همراه با جدایهٔ آمریکا و جدایه نیشکر بود.

در مایه‌زنی از طریق ایجاد زخم روی شاخهٔ بادام، ۳۶ درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار و ۱۰ درصد از جدایه‌های غلات روی شاخه‌ها شانکر ایجاد نمودند، در حالی که جدایه‌های مرکبات، خاک و سلمه توان تولید شانکر را نداشتند. از نظر بیماری‌زایی، بین جدایه‌های نیشکر و جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار تفاوت وجود داشته است، بدین صورت که مایه‌زنی جدایه‌های نیشکر روی برگ نیشکر باعث بروز علائم

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

نوار قرمز گردید، ولی در برگ‌های نیشکر، مایه‌زنی شده با جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، آلودگی ایجاد نشده است. متقابلاً جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار باعث بروز شانکر گسترده روی شاخه‌های هلو و زردآلو شده، ولی جدایه‌های نیشکر فقط در محل مایه‌زنی شانکر محدودی ایجاد نموده‌اند (۲۲).

در مایه‌زنی محل زخم برگ فقط جدایهٔ آمریکا و ۲٤ درصد جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار توانستند روی شاخهٔ بادام بیماری ایجاد نمایند. بهار و همکاران (۳) نیز گزارش نمودند که مایه‌زنی در محل زخم برگ موفقیت‌آمیز نبوده است. در مایه‌زنی شاخهٔ مرکبات، هیچ‌کدام از جدایه‌ها بیماری ایجاد نکردند. یک جدایه از درختان میوهٔ هسته‌دار توانست در محل افتادن برگ مرکبات شانکر محدودی ایجاد کند. نمایندهٔ جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، غلات و مرکبات ۱٤ روز پس از مایه‌زنی به صورت پاشیدن روی برگ، باعث ایجاد سوختگی در برگ گندم و ذرت شدند. بیماری‌زایی جدایه‌های لوبیا، درختان میوهٔ هسته‌دار، گندم و چغندرقند روی ذرت گزارش شده است (۱۱). به منظور بررسی ارتباط سرولوژیک جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف، تمام ٤۹ جدایهٔ مورد آزمایش، در آزمون نشت دوطرفه در آگار، در برابر هر سه آنتی‌سرم تولید شده قرار گرفتند.

نتایج به دست آمده نشان داد که آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار توانایی ایجاد واکنش با بیشتر جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف و همچنین جدایه خاک را داشت. در صورتی که آنتی‌سرم تهیه شده بر علیه جدایهٔ مرکبات قادر به ایجاد واکنش با جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار، غلات، خاک، گردو، سلمه و نیشکر نبود، که نشان دهنده وجود تفاوت‌های سرولوژیک، علاوه بر تنوع در بیماری‌زایی و ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف است.

افیونیان و همکاران (۲) جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف و چند پاتووار دیگر از *P. syringae* را در آزمون‌های نشت دو طرفه در آگار در برابر آنتی‌سرم جدایهٔ نخود فرنگی قرار دادند. نتایج گویای واکنش جدایه‌های گیلاس، زردآلو، کیوی، سیب، گلابی، توت، نخود فرنگی و یک جدایه از *P. s.* pv. *tomato* با آنتی‌سرم فوق بود، ولی جدایه‌های توتون، گندم، چغندرقند و گردو با این آنتی‌سرم واکنش ندادند. هم‌چنین، با وجود تفاوت‌های سرولوژیک و بیماری‌زایی در میان جدایه‌های *Pss* از میزبان‌های مختلف، جدایه‌های *Pss* از نظر سرولوژیک با *P. s.* pv. *tomato* مشابه بودند (۲). تیمار حرارتی آنتی‌ژن و افزودن یک درصد SDS بهترین جواب را داد. برای مشاهدهٔ واکنش‌های اختصاصی باید آنتی‌ژن را حرارت داد. تیمار حرارتی عملاً باعث حذف آنتی‌ژن‌های عمومی شده، ولی روی آنتی‌ژن‌های اختصاصی تأثیر اندکی دارد (۲۰).

بررسی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی نشان داد که اختلافات چشم‌گیری بین جدایه‌های میزبان‌های مختلف وجود دارد. جدایهٔ نیشکر با جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار، جدایهٔ سلمه، جدایهٔ مرکبات و جدایهٔ آمریکا تفاوت داشت. جدایهٔ مرکبات نیز در چند باند پروتئینی با جدایه‌های درختان میوهٔ هسته‌دار تفاوت داشت. تفاوت در نقوش الکتروفورز پروتئین جدایه‌های نیشکر و درختان میوهٔ هسته‌دار قبلاً گزارش شده است (۲۲).

سپاسگزاری

نویسندگان از شورای پژوهشی دانشگاه شیراز به خاطر تأمین هزینه‌های این پژوهش در طرح پژوهشی شماره ۱۰۷ C-۷۹-AG-۱۳٤۷ سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

۱. افیونیان، م. و ن. صحراگرد. ۱۳۷٤. بروز بلایت باکتریایی گندم در شهرکرد. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

۲. افیونیان، م.، ح. رحیمیان و م. مزارعی. ۱۳۷٤. خصوصیات بیماری‌زایی و سرولوژیکی تعدادی از پاتورهای *Pseudomonas syringae*. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج.

۳. بهار. م.، ح. مجتهدی و ا. اخیانی. ۱۳٦۱. شانکر باکتریایی درختان زردآلو در اصفهان. بیماری‌های گیاهی ۱۸: ۵۸-٦۸.

٤. رحیمیان، ح. ۱۳٦۸. وقوع بیماری بلایت باکتریایی گندم در کرمان. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۵. ضیائی، م. و م. تقوی. ۱۳۷۹. مقایسهٔ جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall از میزبان‌های مختلف از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

٦. مزارعی، م. و ع. قاسمی. ۱۳۷۲. شناسایی و بررسی تغییرات فصلی جمعیت باکتری‌های مولد یخزدگی درختان میوه هسته‌دار شاهرود. بیماری‌های گیاهی ۲۹: ۱٤۰-۱٤٦.

7. Balestra, G. M. and L. Varvaro. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. J. Phytopathol. 145: 375-378.

8. Canfield, M. L., S. Baca and L. W. Moore. 1986. Isolation of *Pseudomonas syringae* from 40 cultivars of diseased woody plants with tip dieback in Pacific Northwest nurseries. Plant Dis. 70: 647-650.

9. Fahy, P. C. and G. J. Persley. 1983. Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press, Inc., New York.

10. Gardan, L., S. Cottin, C. Bollet and G. Hunault. 1991. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas syringae* van Hall. Res. Microbiol. 14: 995-1003.

11. Gross, D. C. and J. E. Devay. 1977. Population dynamics and pathogenesis of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to *in vitro* production of syringomycin. Phytopathol. 67: 475-483.

12. Hampton, R., E. Ball and S. De-Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. APS Press, St. Paul, MN, USA.

13. Hirano, S. S. and C. D. Upper. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae.* Ann. Rev. Phytopathol. 28: 155-177.

14. Hirano, S. S., D. I. Rouse, M. K. Clayton and C. D. Upper. 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: a study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. Plant Dis. 79: 1085-1093.

15. King, E. D., M. K. Ward and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clinic. Medic. 44: 301-307.

16. Klement, Z., G. L. Farkas and L. Lovrekovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathol. 54: 474-477.

17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

18. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. J. Appl. Bacteriol. 29: 470-489.

19. Lindow, S. E. 1982. Epiphytic ice nucleation-active bacteria. PP. 335-362. *In:* M. S. Mount and G. H. Lacy (Eds.), Phytopathogenic Prokaryotes. Vol. 1, Academic Press, New York.

20. Otta, J. D. and H. English. 1971. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae.* Phytopathol. 61: 443-452.

21. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. Pseudomonas Migula 1894. PP. 141-199. *In*: N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilking, Baltimore.

22. Rahimian, H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas* pv. *syringae* in Iran. J. Phytopathol. 143: 321-324.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]

23. Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed., APS Press, St. Paul, MN, USA.

24. Sellam, M. A. and D. Wilcoxson. 1976. Bacterial leaf blight of wheat in Minnesota. Plant. Dis. Rep. 60: 242-245.

25. Suslow, T. U., M. N. Schroth and M. Isaka. 1982. Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathol. 72: 917-918.

26. Yessand-Carreau, S., C. Manceau and J. Luisetti. 1994. Occurrence of specific reactions induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. Plant Pathol. 43: 528-536.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.1.16.0]