

آفات و بیماری‌های گیاهی

جلد ۸۶، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۷

تعیین ویژگی‌های *Pseudomonas syringae* pv. *porri* عامل لکه برگ و سوختگی باکتریایی پیاز در استان‌های فارس و کرمانشاه

یوسف مرادی امیرآباد^۱، غلام خداکرمیان^۱✉

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، ایران

(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷)

چکیده

علائم لکه برگ و سوختگی باکتریایی روی بوته‌های پیاز *Allium cepa* L. در استان‌های فارس (اقلید) و کرمانشاه (بیستون) با نرخ وقوع ۹۰ تا ۱۰۰ درصد روی بوته‌های پیاز مشاهده شد. به منظور جداسازی و شناسایی عامل بیماری، نمونه‌های مشکوک از سطح مزرعه‌های آلوده جمع‌آوری گردید. پس از کشت روی محیط آگار غذایی، ۳۰ جدایه باکتریایی جداسازی شد. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی تعدادی از گونه‌های *Allium* spp. انجام و بیماری‌زایی آن‌ها روی پیاز، پیازچه و تره‌فرنگی اثبات گردید. این جدایه‌ها از نظر الگوی پروتئین سلولی الکتروفورز شده به روش SDS-PAGE یکسان بودند. براساس ویژگی‌های فنوتیپی مانند تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King'B، آزمون LOPAT و استفاده از منابع کربنی مختلف، جدایه‌ها به *Pseudomonas syringae* pv. *porri* شبیه بودند. همه جدایه‌ها با استفاده از BOX-PCR الگوی بانندی یکسانی را نشان دادند. نتایج حاصل از تکثیر و توالی‌یابی ژن کد کننده 16S rRNA و ژن‌های خانه‌داری *gyrB* و *rpoD* نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی متعلق به *P. syringae* pv. *porri* هستند. این اولین گزارش از وجود باکتری *P. syringae* pv. *porri* در استان کرمانشاه می‌باشد. مدیریت بیماری برای جلوگیری از اپیدمی آن ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: *Allium cepa*، سوختگی، *Pseudomonas syringae* pv. *porri*، LOPAT، فیلوژنتیک

Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *porri* as the causal agent of bacterial leaf spot and blight of onion in Fars and Kermanshah provinces of Iran

Y. MORADI AMIRABAD¹ and G. KHODAKARAMIAN¹✉

1- Respectively Ph.D. student and Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

The symptoms of bacterial leaf spot and blight on onion (*Allium cepa* L.) plants were observed in Fars (Eghlid) and Kermanshah (Bistoun) provinces with the rate of occurrence varying from 90 to 100% of the plants. In order to isolation and identification of the causal agent, suspicious samples were collected from infected fields. By culturing the samples on nutrient agar medium, 30 bacterial isolates were obtained. Pathogenicity test of the isolates on *Allium* spp. was performed and their pathogenicity was proved on onion, spring onion and leek. The isolates showed an identical total cell soluble protein pattern in SDS-PAGE. The isolates were similar to *Pseudomonas syringae* pv. *porri* based on phenotypic characteristics such as production of fluorescent pigment in KB medium, LOPAT tests, and utilization of different carbon sources. Genomic profiles generated with BOX-PCR placed the isolates into one groups. The results of the amplification and sequencing of the 16S rRNA, *gyrB*, and *rpoD* genes showed that the isolates belong to *P. syringae* pv. *porri*. This is the first report of the presence of the *P. syringae* pv. *porri* in Kermanshah province. Management of the disease seems to be necessary to prevent the disease epidemic.

Key words: *Allium cepa*, blight, *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, LOPAT, phylogenetic

مقدمه

منشاء پیاز با نام علمی *Allium cepa* L. برخی کشورهای آسیای غربی مانند ایران، غرب پاکستان و افغانستان بوده و یکی از سبزی‌های مهم تجاری در سراسر جهان است (George, 2009). براساس آمار سازمان خوار و بار جهانی در سال ۲۰۱۶ (FAOSTAT, 2016) ایران با سطح زیر کشت ۶۱۸۰۹ هکتار و تولید ۲۳۴۵۷۶۸ تن پیاز در سال رتبه ششم را در جهان دارد. تعداد زیادی از آفات و بیماری‌ها از جمله باکتری‌های بیمارگر گیاهی به اندام هوایی و زیرزمینی پیاز حمله می‌کنند و موجب کاهش کمی و کیفی محصول آن می‌شوند. تعدادی از باکتری‌های وابسته به جنس سودوموناس بیماری‌زای گیاهی هستند و علائم مختلف از جمله شانکرها، سرخشکیدگی‌ها، سوختگی‌های شکوفه، سرشاخه، برگ یا دانه، لکه برگه‌ها (پاتوورهای *P. syringae*)، پوسیدگی‌های نرم یا قهوه‌ای (پاتوورهای *P. viridiflava* و *P. marginalis*)، گال‌ها (پاتوورهای *P. savastanoi*) و سوختگی‌های قارچ (*P. agarici* و *P. tolaasii*) را ایجاد می‌کنند (Schaad et al., 2001). مهم‌ترین گونه بیماری‌زای جنس سودوموناس گونه *Pseudomonas syringae* است که این جنس به زی‌برده *Gammaproteobacteria* تعلق دارد (Kersterson et al., 1996).

باکتری *P. syringae* شامل همه استرین‌های سودومونادهای فلورستنی می‌شود که آزمون‌های اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز آن‌ها منفی بوده و قادر به القای واکنش فوق حساسیت روی تنباکو می‌باشند. این باکتری روی دامنه وسیعی از گیاهان، از جمله محصولات کشاورزی مهم و اقتصادی موجب بیماری می‌شود (Palleroni, 1984). اگرچه استرین‌های *P. syringae* تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌کنند، اما هر استرین درجه‌ای از اختصاصیت میزبانی را نشان می‌دهد. بنابراین، *P. syringae* sensu lato براساس گونه گیاهی میزبانی که استرین از آن جدا شده است، از نظر تاکسونومیکی به بیش از ۶۰ پاتووار تقسیم شده است

(Young, 2010). به استرین یا مجموعه‌ای از استرین‌ها که از نظر بیمارگری و دامنه میزبانی، از سایر استرین‌های همان گونه متمایز باشند، پاتووار گفته می‌شود (Dye et al., 1980). آزمون‌های تعیین‌کننده LOPAT (لوان، اکسیداز، لهیدگی سبب زمینی، آرژنین دی‌هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی تنباکو) برای تشخیص گونه‌های *Pseudomonas* spp. بیمارگر گیاهی استفاده می‌شوند، اما این آزمون‌ها برای تشخیص پاتووارها در *P. syringae* مفید نیستند (Lelliott et al., 1966; Bull et al., 2011). سیستم BIOLOG با استفاده از ۹۵ منبع کربنی تایید کرد که *P. syringae* ناهمگن است و پاتووارهای آن براساس یک الگوی متابولیکی از هم تفکیک می‌شوند (Rudolph, 1995). پاتووارهای *P. syringae* ۴۰-۱۰۰ درصد همسانی توالی DNA دارند، در حالی که همسانی DNA بین جدایه‌های یک پاتوورا خاص ۹۵-۱۰۰ درصد است (Palleroni et al., 1972).

اثر انگشت ژنومی BOX-PCR ابزاری است که برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی در سطح گونه ژنومی (Marques et al., 2008; Rademaker and De Bruijn 1997) و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی (Louws et al., 1999) استفاده می‌شود. روش‌های اثر انگشت ژنومی براساس PCR برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌های مرتبط با گیاه در سطح زیرگونه به کار برده می‌شوند (Louws et al., 1994, 1999). اثبات شده است که می‌توان از این روش‌ها برای شناسایی و گروه‌بندی استرین‌های متعلق به پاتووارهای مختلف *Pseudomonas syringae* استفاده کرد (Weingart and Volksch, 1997).

به دلیل حفاظت‌شدگی بسیار بالای ناحیه 16S rRNA، آنالیز توالی‌های ناحیه 16S rRNA یک روش استاندارد برای شناسایی باکتری‌ها می‌باشد، اما تغییرپذیری میان توالی 16S rRNA جنس‌ها و گونه‌های پروکاریوتی موجب شده است تا این ژن برای شناسایی باکتری‌ها در سطح جنس و گونه بسیار مفید باشد. با این وجود ژن‌های با حفاظت‌شدگی کمتری از جمله *rpoD* و *gyrB* نیز وجود دارد که برای تمایز گونه‌های

مزرعه‌های با آبیاری بارانی شهرستان‌های اقلید استان فارس و بیستون کرمانشاه مشاهده گردید. بیماری تا حدود زیادی مزرعه‌های دارای آبیاری بارانی را آلوده کرده بود. علائم در مزرعه شامل سوختگی برگ و لکه‌های قهوه‌ای، آب‌سوخته و نامنظم با طول ۳-۱۱ سانتی‌متری روی برگ بودند (شکل ۱). جداسازی عامل باکتریایی از بافت‌های دارای علائم صورت گرفت. هدف از این بررسی جداسازی و تعیین مورفولوژیکی، مولکولی و بیماری‌زایی جدایه‌ها و شناسایی آن‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی ژن‌های 16S rRNA، *gyrB*^۱ و *rpoD*^۲ است.

روش بررسی

جدایه‌ها

نمونه برداری از بوته‌های پیاز مزارع آلوده شهرستان‌های اقلید و بیستون انجام گردید. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی قرار داده شد و جهت جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از گندزدایی سطحی برگ‌ها با اتانول ۷۰ درصد، قطعات کوچکی از مرز بین بافت سالم و بیمار برگ در چند قطره آب مقطر استریل خرد شدند و بعد از ۱۰-۱۵ دقیقه نگاه‌داری در دمای اتاق، یک لوپ پر از سوسپانسیون روی محیط آگار غذایی (NA)^۳ مخطط شد. تشتک‌های پتری کشت داده شده در دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس نگاه‌داری شدند و بعد از دو تا سه روز، تک کلونی‌های رشد یافته روی محیط جدا شده و دوباره روی محیط آگار غذایی حاوی دو درصد سوکروز (NAS)^۴ کشت و پس از دو روز رشد، برای نگاه‌داری کوتاه مدت، در دمای ۶-۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. برای بررسی‌های بیشتر سوسپانسیون کدری از رشد ۴۸ ساعته جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و در یخچال (۶-۴ درجه سلسیوس) نگاه‌داری شد.

باکتریایی بسیار نزدیک از نظر فیلوژنتیکی مفیدتر می‌باشند (Keshtkar et al., 2016).

آنالیز فیلوژنتیکی توالی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* می‌تواند کاستی‌های بین آنالیز توالی‌های 16S rRNA و مطالعات هیبریداسیون DNA-DNA را رفع کند (Yamamoto et al., 2000).

لکه برگی باکتریایی پیاز اولین بار در سال ۱۹۷۲ در ژاپن گزارش شد که عامل این بیماری با استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی و باکتری شناسی به‌عنوان یک استرین بیمارگر اختصاصی از *Pseudomonas syringae* شناسایی گردید (Goto, 1972). سوختگی باکتریایی تره‌فرنگی یک بیماری نزدیک به لکه برگی باکتریایی پیاز است که اولین بار در سال ۱۹۵۲ عامل این بیماری یک باکتری *Pseudomonas* گزارش شد (Lelliot, 1952) و بعد از دو دهه این پاتوژن *P. syringae* نامیده شد (Hale, 1975). سپس، این باکتری براساس تحقیقات گسترده‌تری که صورت گرفت به‌عنوان پاتووار جدید *P. syringae* pv. *porri* طبقه‌بندی شد (Samson et al., 1998). تره‌فرنگی *Allium porrum*، به‌عنوان میزبان اصلی این پاتوژن شناخته می‌شود، ولی این باکتری روی پیاز *Allium cepa* نیز تشخیص داده شده است (Noble et al., 2006). باکتری *P. syringae* pv. *porri* از انگلستان، فرانسه، نیوزلند، هلند، ایتالیا، ایالات متحده، استرالیا، یونان، ژاپن و کره جنوبی و ایران گزارش شده است (Rombouts et al., 2016; Moradi Amirabad et al., 2017). باکتری *P. syringae* pv. *porri* هم‌چنین به‌عنوان عامل لکه برگی باکتریایی پیاز و موسیر *Allium stipitatum*، از استرالیا گزارش شده است. این باکتری از طریق بذر نیز منتقل می‌شود (Ikene et al., 2003) اما پسماند محصول نیز در انتقال آلودگی به گیاهان جدید نقش دارد (Van Overbeek et al., 2010). علائم معمول این بیماری شامل پیچیدگی و زردی رگبرگ میانی در گیاهان جوان و وجود لکه‌های آب‌سوخته روی گیاهان مسن‌تر و ساقه گل‌دهنده است (Noble et al., 2006; Samson et al., 1998).

در سال ۱۳۹۶ لکه برگی و سوختگی باکتریایی پیاز در

۱- DNA gyrase, subunit B

۲- RNA polymerase, sigma 70 (sigma D) factor

۳- Nutrient agar

۴- Nutrient agar sucrose

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی روی پیاز، تره‌فرنگی، پیازچه و سیر انجام گرفت. گیاهان را به‌صورت جداگانه در گلدان کشت داده و در گلخانه نگهداری شدند. سوسپانسیونی با غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته همه جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه شد. برای هر جدایه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به دو یا سه برگ از هر گیاه با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد. گیاهان شاهد با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند. گیاهان مایه‌زنی شده برای حفظ شرایط مرطوب، به مدت ۴۸ ساعت با کیسه پلاستیکی شفاف پوشیده شدند و در دمای محیط نگهداری شدند و به‌منظور مشاهده علائم تا دو هفته به‌صورت روزانه مورد بازرسی قرار گرفتند (Schaad *et al.*, 2001).

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی روی همه جدایه‌های به‌دست آمده براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شد. واکنش گرم با استفاده از روش حلالیت در پتاس ۳ درصد (Suslow *et al.*, 1982)، آزمون‌های رشد هوازی و بی‌هوازی (Hugh and Leifson, 1953)، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، کازئین و اسکولین، احیاء نیترات و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB^0 (Schaad *et al.*, 2001)، و توانایی ایجاد فوق حساسیت در شمعدانی (Klement *et al.*, 1964) انجام گرفت. آزمون‌های تولید لوان، واکنش اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی، آرژنین دی‌هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی تنباکو (LOPAT) نیز انجام شد (Lelliott *et al.*, 1966). آزمون استفاده از منابع مختلف کربنی در محیط کشت پایه آیر و همکاران (Ayer *et al.*, 1919) انجام شد.

SDS-PAGE

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی جدایه‌ها به روش ناپیوسته لملی با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) انجام شد. برای این منظور سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته

هر جدایه روی محیط کشت آگار غذایی در میکروتیوب‌های حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر (ضریب جذب ۱ در طول موج ۶۳۰ نانومتر) تهیه و سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (حاوی 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01 bromophenol blue, 1.5% β -mercaptoethanol) به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از سرد شدن میکروتیوب‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس، نمونه‌ها در ۱۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل و نمونه‌های پروتئینی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید با استفاده از سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) انجام گرفت. پنجاه میکرولیتر از پروتئین‌های محلول هر یک از جدایه‌ها درون هر چاهک ژل ریخته شد. پروتئین‌ها در ژل جداکننده ۱۰ درصد با جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر به مدت ۵ ساعت براساس اندازه از هم تفکیک شدند. ژل در محلول متانول، آب، اسید استیک (۱:۵:۵) حاوی ۰/۲۵ درصد کومازی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و سپس در محلول متانول، آب، اسید استیک بدون کومازی بریلیانت بلو، رنگ‌بری و در اسید استیک ۷ درصد نگهداری شد (Rahimian 1995).

استخراج DNA ژنومی

به‌منظور استخراج DNA ژنومی، سوسپانسیون نیمه کدردی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط NA در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر برابر ۱ تنظیم شد. به‌منظور لیز شدن سلول‌ها، ۱۵ میکرولیتر پتاس (KOH) ۱۰ درصد به هر سوسپانسیون اضافه شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس در بن‌ماری قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه لیز شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس لایه رویی به‌عنوان DNA به لوله‌های جدید منتقل و در دمای

کدام از آغازگرها (معادل ۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، یک میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۳ میکرولیتر (با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر) آنزیم پلی‌مراز تک (Taq Polymerase) (سیناژن، ایران) به‌همراه یک میکرولیتر از نمونه DNA هر جدایه انجام شد. برنامه دمایی برای تکثیر ژن کد کننده 16S rRNA شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱/۵ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و دو دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. یک مرحله بسط رشته‌ها به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس نیز به کار برده شد.

برنامه دمایی برای تکثیر ژن‌های *gyrB* و *rpoD* شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه در دمای ۶۳ سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. یک مرحله بسط رشته‌ها به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس نیز به‌کار برده شد.

الکتروفورز محصولات PCR

سه میکرولیتر از محصول PCR جدایه‌ها با رنگ بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد ریخته شد. در یک چاهک نشانگرهای جرم مولکولی DNA (SM0311 شرکت فرمتاس) ریخته شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱/۵ ساعت در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. سپس ژل آگارز در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل داکومنت از آن عکس برداری صورت گرفت (Ausuble et al., 1992).

توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنی

بعد از تکثیر قطعه‌ها، محصولات PCR به شرکت بایونیر^۶ کره جنوبی ارسال و توالی آن‌ها به روش پایان‌دهی زنجیره^۷ تعیین گردید. توالی‌ها با نرم‌افزار BioEdit ver. 7.0.9.0

۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Arabi et al., 2006; Rouhrazi and Rahimian 2012; Keshtkar et al., 2016; Moradi Amirabad and Khodakaramian, 2017).

به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، میزان جذب نوری نمونه‌های استخراج شده در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که نسبت ضریب جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ حدود ۱/۸ تا ۲ داشتند، به‌عنوان DNA استخراج شده با کیفیت مطلوب در نظر گرفته شدند (Sambrook et al., 1989).

BOX-PCR

اثر انگشت ژنومی با استفاده از پرایمر BOXAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') انجام گرفت (Renick et al., 2008). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۳ میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰x (500 mM KCl, Tris-HCl) (اسیدیته ۸/۴)، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر BOXAIR (۱۰ پیکومول) و ۱/۲۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq polymerase) (سیناژن، ایران) انجام گرفت. شرایط واکنش به شرح زیر صورت گرفت: واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و سپس گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد (Rademaker and de Bruijn, 1997).

تکثیر نواحی 16S rDNA، *gyrB* و *rpoD* با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

به‌منظور تکثیر ژن 16S rRNA از آغازگرهای FD1 و Rp2 استفاده شد (Weisburg et al., 1991). هم‌چنین ژن‌های خانه‌داری *gyrB* (با آغازگرهای *gyrB*-Fpsc و *gyrB*-Rpsc) و *rpoD* (با آغازگرهای *rpoD*-Fpsc و *rpoD*-Rpsc) تکثیر شدند (Sarkar and Guttman, 2004). واکنش‌های PCR به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر مدل TC-512 (Techne) با حجم کل ۲۵ میکرولیتر انجام شد. واکنش PCR حاوی یک میکرولیتر از هر

^۶- Bioneer

^۷- Chain termination

(Serfontein 2001; *et al.*, 2004). با توجه به این که سودومونادهای فلورسنت روی محیط کشت King'B رنگدانه فلورسنت تولید می‌کنند (Schaad *et al.*, 2001)، این جدایه‌ها در گروه سودومونادهای فلورسنت قرار می‌گیرند. استرین‌های باکتری بیماری‌گر گیاهی *P. syringae* با درجه بالایی از ناهمگونی در ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مشخص می‌شوند. از *P. syringae* و گونه‌های وابسته، بیش از ۵۰ آرایه درون‌گونه‌ای به نام پاتووار بر اساس بیماری‌زایی متمایز آن‌ها روی یک یا چند گونه گیاهی میزبان توصیف شده است (Young *et al.*, 1996). با این حال، *P. syringae* به عنوان یک بیمارگر فرصت‌طلب شناخته می‌شود و شامل هر دو گونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا است که همه آن‌ها قادر به القای واکنش فوق حساسیت در تنباکو هستند (Hirano and Upper, 1990).

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی و نام جدایه‌های به دست آمده از لکه برگگی و سوختگی باکتریایی پیاز در استان‌های فارس و کرمانشاه ایران.

Table 1. Geographical location and name of the isolates obtained from bacterial leaf spot and blight of onion in Fars and Kermanshah provinces of Iran.

Name of isolates	Location	Host
YMAoF1, YMAoF2, YMAoF3, YMAoF4, YMAoF5, YMAoF6, YMAoF7, YMAoF8, YMAoF9, YMAoF10, YMAoF11, YMAoF12, YMAoF13, YMAoF14, YMAoF15, YMAoF16, YMAoF17, YMAoF18	Fars province (Eghlid)	Onion
YMAoK1, YMAoK2, YMAoK3, YMAoK4, YMAoK5, YMAoK6, YMAoK7, YMAoK8, YMAoK9, YMAoK10, YMAoK11, YMAoK12	Kermanshah province (Bisetoun)	

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

تمام جدایه‌ها گرم منفی و هوازی اجباری بودند. این جدایه‌ها در آزمون‌های تولید رنگدانه فلورسنت، کاتالاز، تولید لووان و واکنش فوق حساسیت روی تنباکو دارای واکنش مثبت و در آزمون‌های احیای نیترات، اکسیداز، آرژنین دی‌هیدرولاز، هیدرولیز اسکولین و کازئین منفی بودند. همه جدایه‌ها در آزمون هیدرولیز ژلاتین مثبت ضعیف بودند. جدایه‌ها از دی-گلوکز، مانوز، زایلوز، فروکتوز، ترهالوز، سوربیتول، ملیبیوز،

(Hall, 1999) اصلاح و با استفاده از نرم‌افزار بلاست ۸ همسانی آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن^۹ مقایسه شد. توالی‌ها در بانک ژن ثبت گردیدند. برای هم‌ردیف‌سازی^{۱۰} توالی‌های به دست آمده و توالی‌های موجود در بانک ژن از نرم افزار Clustal W استفاده شد (Thompson *et al.*, 1994). درخت فیلوژنی توسط نرم‌افزار مگا^{۱۱} (Kumar *et al.*, 2016) با مدل فاصله‌ای کیمورا-۲ پارامتر^{۱۲} به روش اتصال همسایگی^{۱۳} (Saitou and Nei, 1987) با درجه اعتبارسنجی^{۱۴} (Felsenstein, 1985) رسم شد.

نتیجه و بحث

افزایش لکه برگگی و سوختگی باکتریایی پیاز و ضررهای اقتصادی مرتبط با آن، نظر ما را به شناسایی عامل این بیماری و همچنین تعیین دامنه میزبانی آن جلب کرد. این بیماری در سال ۱۳۹۶ در مزارع با آبیاری بارانی شهرستان‌های اقلید فارس و بیستون کرمانشاه با نرخ وقوع ۹۰ تا ۱۰۰ درصدی روی بوته‌های پیاز با علائم سوختگی و لکه‌های قهوه‌ای و سفید نامنظم و آب‌سوخته روی سطح برگ مشاهده گردید (شکل ۱).

در این بررسی از برگ بوته‌های دارای علائم لکه برگگی و سوختگی باکتریایی از مناطق مختلف شهرستان‌های اقلید استان فارس و بیستون استان کرمانشاه ۳۰ جدایه با کلنی‌هایی به رنگ بژ، گرد و با حاشیه صاف روی محیط آگار غذایی جداسازی شدند (جدول ۱). همه جدایه‌ها در محیط کشت King's B رنگدانه فلورسنت را تولید کردند. در بررسی‌های صورت گرفته در خارج از ایران، عوامل سوختگی پیاز باکتری‌های *P. syringae* pv. *porri* و *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* گزارش شده است (Myung *et al.*, 2011; Roumagnac

۸- Basic local alignment search tool

۹- GeneBank

۱۰- Alignments

۱۱- MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0)

۱۲- Kimura-2-parameter distance model

۱۳- Neighbor Joining

۱۴- Bootstrap

بسیار مفیدی در تفکیک پاتووراهای *P. syringae* از همدیگر می‌باشد (Palmer and Cameron, 1971; Mohammadi *et al.*, 2010). با توجه به نتایج سایر محققین ذکر شده در بالا، آنالیز SDS-PAGE تا حدودی می‌تواند پاتووراهای *Pss* را از هم‌دیگر تفکیک کند. در این تحقیق، مقایسه الگوی پروتئین سلولی نشان داد که همه جدایه‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند. بر این اساس، شاید نتوان اظهار کرد که همه جدایه‌ها به یک پاتورا تعلق دارند، اما می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه‌ها از نظر الگوی پروتئینی مشاهده شده، کاملاً یکسان هستند.

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های به‌دست آمده از بوته‌های پیاز آلوده به لکه برگگی و سوختگی باکتریایی در استان‌های فارس و کرمانشاه ایران

Table 2. Phenotypic characteristics of isolates obtained from bacterial leaf spot and blight of onion in Fars and Kermanshah provinces of Iran.

Reaction of strains	Test	Reaction of strains	Test
+	Sorbitol	-	Gram reaction
-	Lactose	+	KOH 3%
+	D(+)-glucose	O	Oxidative/Fermentative
+	D-galactose	-	Oxidase
+	Maltose	+	HR
-	D(-)-tartrate	+	Levan formation
+	Sucrose	+	Catalase
-	D-arabinose	+	Flourescent pigment
+ ^w	Salicin	+ ^w	Gelatin hydrolysis
+	Amygdaline	-	Casein hydrolysis
+	Melibiose	-	Esculin hydrolysis
-	Cellobiose	-	Arginine dihydrolase
+	Mannose	-	Potato rot
-	L-Rhamnose	-	Growth at 37°C
-	Inositol	-	Nitrate reduction
+	Xylose	-	Utilization of:
+	L-arginine	+	Trehalose
+	Fructose	+ ^w	Tyrosine
-	Erythriol	+ ^w	D-phenyl alanine

w: Weak reaction or slow growth ضعیف

+: همه (بیش از ۹۰ درصد) جدایه‌ها مثبت

+ : All isolates (≥90%) positive or utilize

- : همه (بیش از ۹۰ درصد) جدایه‌ها منفی

- : All isolate (≥90%) negative or no growth

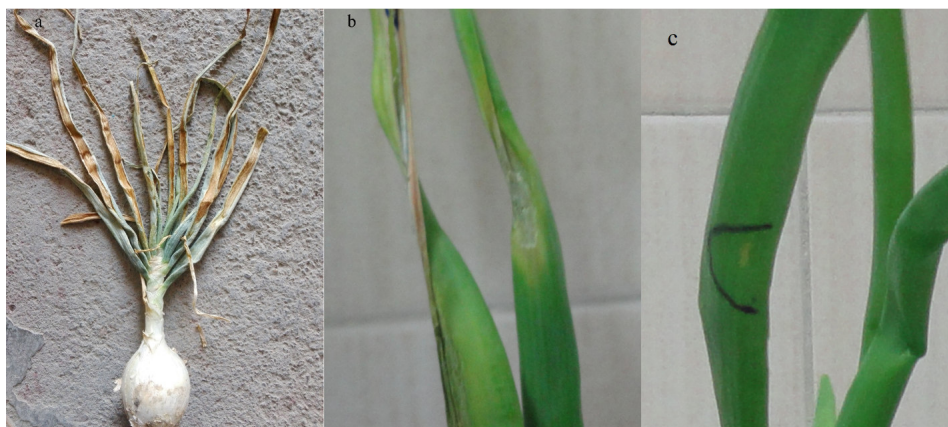
آمیگدالین، مالتوز و سوکروز به عنوان منبع کربن استفاده کردند اما قادر به استفاده از اریتریتول، اینوزیتول، سلوبیوز، دی-تارترات و لاکتوز نبودند. نتایج آزمون‌های انجام شده در جدول ۲ خلاصه شده است.

براساس آزمون‌های LOPAT، همه جدایه‌ها در گروه Ia (+, -, -, +) متعلق به *Pseudomonas syringae* قرار گرفتند (Lelliott *et al.*, 1996). از میان ۱۵ آزمون بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و استفاده از ۲۲ منبع کربوهیدراتی و اسیدآمینهای، جدایه‌های به‌دست آمده از پیاز از نظر استفاده از اریتریتول، تیروزین و سوربیتول با پاتووراهای *P. syringae* *pv. syringae* و *pv. alli* متفاوت بودند. این جدایه‌ها از نظر استفاده از زایلوز با *P. syringae* *pv. alli* تفاوت نداشته ولی با *P. syringe* *pv. syringae* تفاوت داشتند (Moloto *et al.*, 2017). براساس نتایج آزمون‌های انجام شده و مقایسه آن‌ها با نتایج سایر پژوهشگران، این جدایه‌ها بیشترین شباهت را به *P. syringae* *pv. porri* دارند (Samson *et al.*, 1998).

مقایسه الگوی پروتئین سلولی جدایه‌ها در SDS-PAGE

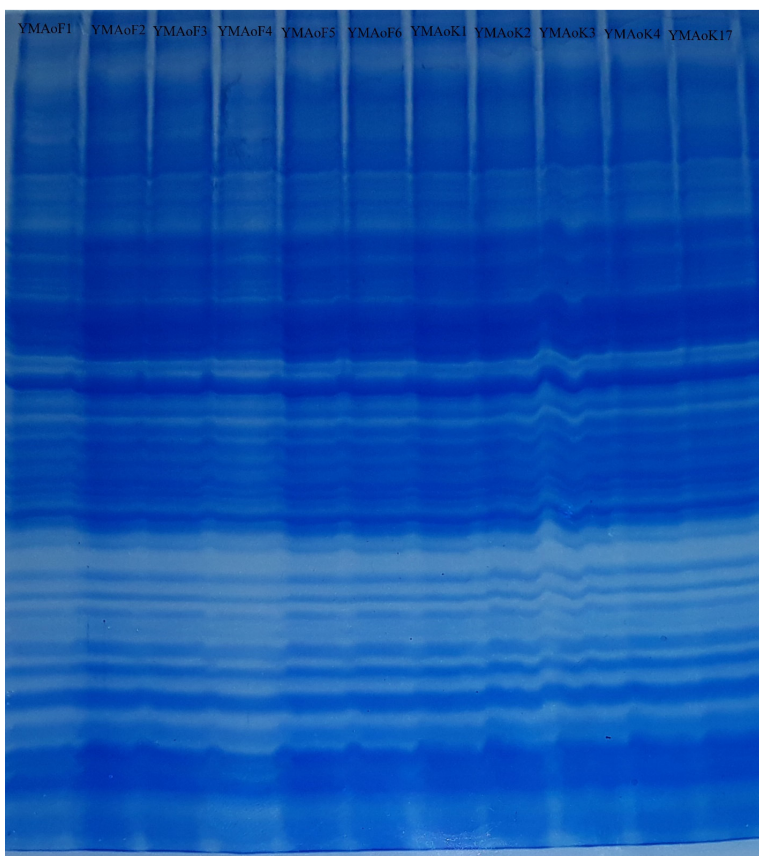
همه جدایه‌ها الگوی پروتئینی یکسانی را در SDS-PAGE نشان دادند (شکل ۲). الگوی پروتئینی جدایه‌های پیاز استان‌های فارس و کرمانشاه اختلافی نشان ندادند.

ثابت شده است که داده‌های SDS-PAGE پروتئین‌های سلولی کل ارزش بالایی برای شناسایی جدایه‌های جدید به‌دست آمده از نمونه‌های زیست‌محیطی دارد (Vancanneyt *et al.*, 1996). نشان داده شده است که مقایسه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین برای شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه بسیار مفید می‌باشد و استرین‌های دارای الگوی پروتئینی کاملاً مشابه احتمالاً به یک گونه تعلق دارند (Kerstens *et al.*, 1994). هم‌چنین، بسته به تفاوت‌های کم اما تکرارپذیر در الگوهای پروتئینی در یک تاکسون مشخص، ممکن است اطلاعات تاکسونومیکی در سطح درون گونه‌ای نیز فراهم شود (Brosch *et al.*, 1996). آنالیز SDS-PAGE می‌تواند پاتووراهای *P. syringae* را از هم تمییز دهد. هم‌چنین، تأیید شده که آنالیز پروتئین الکتروفوریتیک روش



شکل ۱- لکه برگ و سوختگی باکتریایی پیاز ایجاد شده توسط *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (A) علائم لکه برگ و سوختگی باکتریایی پیاز در مزرعه (B) علائم ایجاد شده بعد از تلقیح مصنوعی باکتری به برگ‌های پیاز (C) گیاه شاهد تلقیح شده با آب مقطر استریل.

Fig. 1. Leaf spot and blight bacteria of onion caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. (a) Leaf spot and blight bacteria of onion in the field (b) Symptoms caused after inoculation in onion leaves (c) Control plant inoculation with sterile distilled water.



شکل ۲- آنالیز SDS-PAGE پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌های به‌دست آمده از پیاز در استان‌های فارس و کرمانشاه.

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of cell soluble proteins from onion strains from Fars and Kermanshah provinces.

بیماری‌زایی جدایه‌ها

بیماری‌زایی با مایه‌زنی گیاهان پیاز، سیر، پیازچه و تره‌فرنگی انجام شد. سه تا چهار روز بعد از مایه‌زنی جدایه‌های منتخب، علائم معمول سوختگی روی برگ‌های پیاز، پیازچه و تره‌فرنگی مشاهده شد ولی علائمی روی برگ‌های سیر مشاهده نگردید (شکل ۱). سه تا چهار روز بعد از مایه‌زنی جدایه‌های به‌دست آمده، لکه‌های آب‌سوخته با حاشیه زرد رنگی روی برگ پیاز ایجاد شد. ۶ روز بعد از مایه‌زنی، نواحی نکروتیک در طول رگبرگ‌های برگ پیاز کشیده شده بود. برای تکمیل اصول کخ، کلنی‌ها از همه گیاهان دارای علائم، روی محیط King's B دوباره جداسازی شدند که آزمون‌های LOPAT (Lelliott et al., 1966) همه جدایه‌های دوباره جداسازی شده نتایج یکسانی را با جدایه‌های اولیه داشتند. در گیاهان شاهد که با آب مقطر استریل مایه‌کوبی شده بودند، هیچ علائمی مشاهده نگردید. بیماری‌زایی *P. syringae* pv. *porri* روی پیاز، پیازچه و تره‌فرنگی اثبات شده است (Moloto et al., 2017).

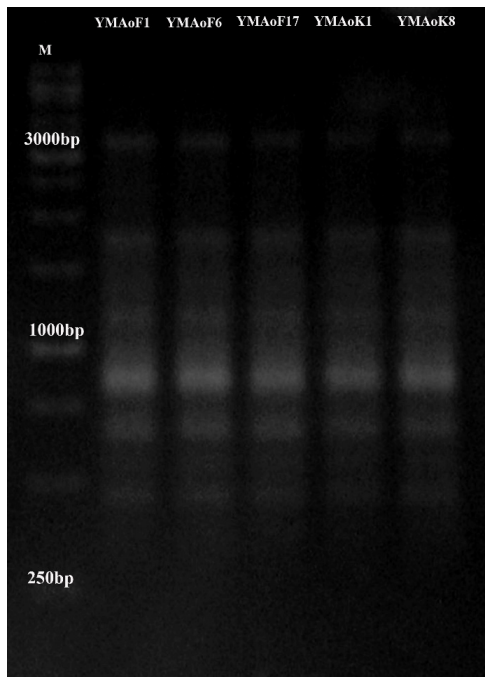
از این نظر که این جدایه‌ها علاوه بر پیاز، توان بیماری‌زایی روی پیازچه و تره‌فرنگی را نیز داشتند، بنابراین جدایه‌های به‌دست آمده از پیاز نتایج مشابهی را با آزمون‌های بیماری‌زایی *P. syringae* pv. *porri* در سایر مطالعات محققین نشان دادند (Moloto et al., 2017).

استخراج DNA ژنومی

DNA استخراج شده از جدایه‌ها با روش الکتروفورز در ژل آگارز، باند مشخص با جرم مولکولی بالا را در ژل تولید کرد. هم‌چنین نسبت ضریب جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر DNA استخراج شده از هر یک از استرین‌ها، حدود ۱/۸ بود. DNA استخراج شده با این شرایط به‌عنوان DNA ژنومی با کیفیت مطلوب در نظر گرفته شد. در برخی موارد DNA استخراجی از کیفیت مناسبی نداشت، استخراج دوباره انجام گرفت.

BOX-PCR

مقایسه اثر انگشت ژنتیکی تولید شده با استفاده از پرایمر BOXAIR نشان داد که همه استرین‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۳). نشان داده شده است که BOX-PCR به‌صورت موفقیت‌آمیزی قادر است باکتری‌های زیادی را میان استرین‌های بسیار نزدیک تشخیص دهد (Versalovic et al., 1991, 1994). روش BOX-PCR و سایر روش‌های اثر انگشت ژنومی الگوهای ویژه‌ای را تولید می‌کند که برای تفکیک استرین‌های بیمارگر *Pseudomonas* از گونه‌ها و پنتوارهای مختلف و حتی استرین‌های یک پاتوورا خاص استفاده می‌شود (Weingart and Volksch 1997; Little et al., 1998; Joana et al., 2007; Marques et al., 2008; Gašić et al., 2012; Kaluzna et al., 2010; Çepni and Gürel 2012; Abbasi et al., 2013; al., Keshtkar et al., 2016).



شکل ۳- اثر انگشت ژنومی DNA ژنومی جدایه‌های عامل لکه برگی و سوختگی باکتریایی پیاز به‌دست آمده از استان‌های فارس و کرمانشاه با روش BOX-PCR.

Fig. 3. Banding patterns obtained from amplified DNA fragments by BOX-PCR for bacterial strains causing leaf spot and blight of onion in Fars and Kermanshah provinces of Iran.

تکثیر و توالی یابی ژن‌های *rpoD*، *gyrB* و *16S rRNA*

با توجه به یکسانی الگوی پروتئین سلولی و نتایج آزمون‌های فنوتیپی برای همه جدایه‌ها و الگوی BOX-PCR، دو جدایه YMAoF17 از فارس و YMAoK8 از کرمانشاه برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ژن *16S rRNA* جدایه‌های منتخب توالی یابی و به کمک نرم‌افزار بلاست با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. توالی جدایه‌های YMAoF17 (شماره دسترسی KY684039) و YMAoK8 (شماره دسترسی MF375476) شباهت ۱۰۰ درصدی را با گونه *Pseudomonas syringae* pv. *Porri* نشان دادند. براساس درخت فیلوژنی ترسیمی بر پایه ناحیه *16S rDNA* جدایه‌های منتخب در کنار استرین *P. syringae* pv. *porri* P55 با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد و در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۴). تجزیه و تحلیل توالی ژن *16S rRNA*، به دلیل حفاظت‌شدگی بالای آن، یک روش استاندارد برای شناسایی باکتری‌ها در سطح جنس و گونه می‌باشد (Schaad et al., 2001)، با این وجود سایر ژن‌ها با حفاظت‌شدگی کمتر، برای تشخیص میان گونه‌های باکتریایی نزدیک از نظر فیلوژنتیکی مفیدتر می‌باشند (keshtkar et al., 2016). بنابراین از توالی ژن‌های خانه‌داری *rpoD* و *gyrB* برای شناسایی دقیق‌تر جدایه‌ها استفاده گردید.

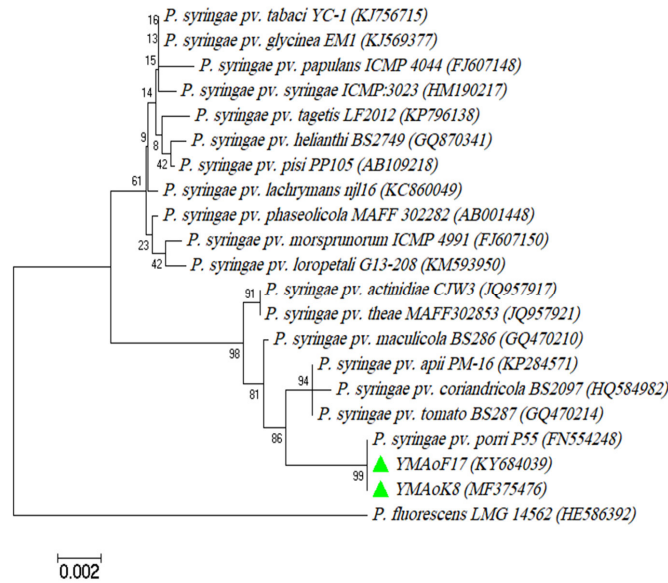
مقایسه توالی ژن‌های خانه‌داری *rpoD* و *gyrB* جدایه‌های YMAoF17 (به ترتیب با شماره دسترسی KY684037 و KY684038) (به ترتیب با شماره دسترسی MF375479 و MF375480) با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن، نشانگر شباهت ۱۰۰ درصدی آن‌ها با توالی‌های مربوط به گونه *Pseudomonas syringae* pv. *porri* بود. براساس درخت فیلوژنی ترسیمی ژن‌های *rpoD* و *gyrB* جدایه‌ها منتخب در کنار سایر استرین‌های *P. syringae* pv. *porri* در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۵) که به همراه درخت‌های فیلوژنی ترسیم

شده بر پایه توالی ناحیه *16S rDNA*، نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بلاست را تأیید کردند.

ژن‌های خانه‌داری *gyrB* و *rpoD* به‌عنوان ژن‌های شاخص برای تعیین مسیر تکامل ژنوم باکتریایی پذیرفته شدند و روابط فیلوژنتیکی سودومونادها با استفاده از توالی این ژن‌ها حل گردید (Sawada et al., 1999). این ژن‌های کدکننده پروتئینی بسیار سریع‌تر از ژن‌های ریبوزومی تکامل یافته‌اند و وضوح بیشتری را نسبت به کاربرد توالی‌های *16S rDNA* فراهم می‌کنند (Yamamoto et al., 2000).

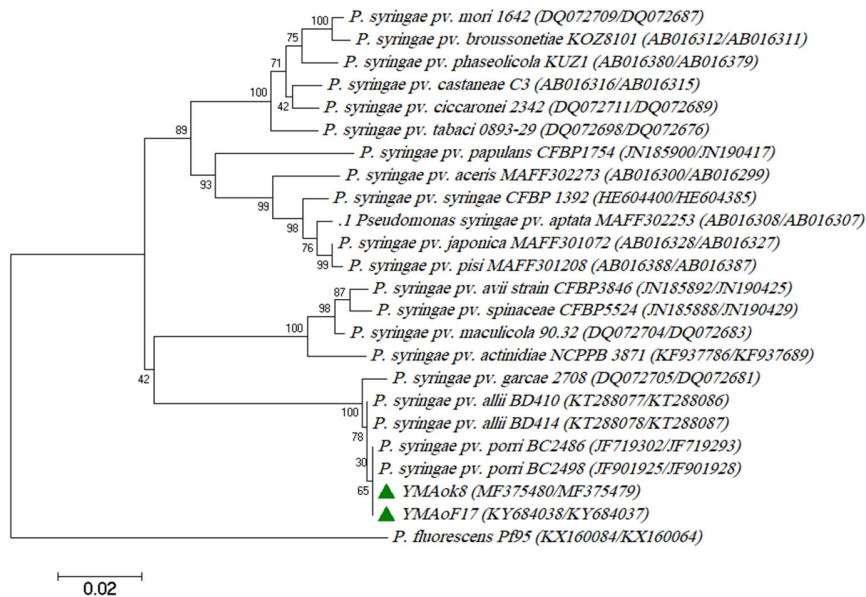
نتایج این مطالعه نشان داد که آزمون‌های فنوتیپی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی به همراه آزمون‌های بیماری‌زایی برای شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای جدا شده از پیازهای آلوده قابل اعتماد می‌باشد. بر اساس الگوی پروتئینی، آزمون‌های فنوتیپی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و آزمون بیماری‌زایی، استرین‌های به‌دست آمده از لکه برگه‌ها و سوختگی‌های برگ پیاز به‌عنوان *P. syringae* pv. *porri* شناسایی شدند. این اولین گزارش از وجود باکتری *P. syringae* pv. *porri* عامل لکه برگه و سوختگی باکتریایی پیاز در استان کرمانشاه می‌باشد.

شرایط محیطی مناسب برای وقوع این بیماری، وجود رطوبت کافی و هوای خنک می‌باشد. برای مدیریت صحیح این بیماری باید از بذرها گواهی شده استفاده شود و باقی مانده محصول از مزرعه جمع‌آوری گردد. آبیاری در دو منطقه اقلید و بیستون به‌صورت بارانی می‌باشد که موجب فراهم شدن شرایط محیطی مناسب برای شیوع بیماری مذکور می‌باشد. در مناطق خشک که مزارع آن‌ها به‌صورت غرقابی آبیاری می‌شوند چنین بیماری تا کنون گزارش نشده است. به نظر می‌رسد با توجه به افزایش روز افزون آبیاری بارانی، یکی از محدودیت‌های آینده کشت پیاز در ایران وقوع بیماری لکه برگه و سوختگی باکتریایی می‌باشد.



شکل ۴- درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ناحیه 16S rDNA جدایه‌های منتخب (YMAoF17 و YMAoK8) عامل لکه برگگی و سوختگی باکتریایی پیاز به‌دست آمده از استان‌های فارس و کرمانشاه ایران و سایر جدایه‌های ثبت شده در ژن بانک با روش اتصال همسایه و با برنامه MEGA7. اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تأیید خوشه‌بندی با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ می‌باشد.

Fig. 4. Neighbor-joining tree based on the 16S rDNA sequences, showing the relationships between the representative isolates from Iran (▲) and other isolates registered in the Gene Bank. Percentage bootstrap is indicated on the internal branches (replicates).



شکل ۵- درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ژن‌های *rpoD* و *gyrB* جدایه‌های منتخب (YMAoF17 و YMAoK8) عامل لکه برگگی و سوختگی باکتریایی پیاز به‌دست آمده از استان‌های فارس و کرمانشاه ایران و سایر جدایه‌های ثبت شده در ژن بانک با روش اتصال همسایه‌ها و با برنامه MEGA7. اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تأیید خوشه‌بندی با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ می‌باشد.

Fig. 5. Neighbor-joining tree based on *rpoD* and *gyrB* gene sequences, showing the relationships between the representative isolates from Iran (▲) and other isolates registered in the Gene Bank. Percentage bootstrap is indicated on the internal branches (replicates).

References

- ABBASI, V., RAHIMIAN, H. and TAJICK-GHANBARI, M. 2013. Genetic variability of Iranian strains of *pseudomonas syringae* pv. *Syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits, *European Journal of Plant Pathology*, No. 135: 225–235.
- ARABI, F., NIKRAVESH, Z., BABAEIZAD, V., REZAEIAN, V. and RAHIMIAN, H. 2006. Occurrence of bacterial leaf spot and blight of garden beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran, *Iranian Journal of Plant Pathology*, No. 42: 655-671. (in Persian with English summary)
- AUSUBLE, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J. and STRUHL, K. 1992. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology, Greene Pub. Associates.
- AYERS, S. H., RUPP, P. and JOHNSON, W. T. 1919. A study of the alkali forming bacteria in milk, U.S. Department of Agriculture Bull, 782p.
- BROSCH, R., LEFÈVRE, M., GRIMONT, F. and GRIMONT, P. A. 1996. Taxonomic diversity of pseudomonads revealed by computer-interpretation of ribotyping data. *Systematic and applied microbiology*, No. 19: 541-555.
- BULL, C. T., CLARKE, C. R., CAI, R., VINATZER, B. A., JARDINI, T. M. and KOIKE, S. T. 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley, *Phytopathology*, No. 101: 847-858.
- ÇEPNI, E. and GÜREL, F. 2012. Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates, *Genetics and Molecular Biology*, No. 35: 650–656
- DYE, D. W., BRADBURY, J., GOTO, M., HAYWARD, A. C., LELLIOTT, R. A. and SCHROTH, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains, *Review of Plant Pathology*, No. 59: 153-168.
- FAOSTAT, F. 2016. Statistical data. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, No. 39: 783-791.
- GAŠIĆ, K., PROKIĆ, A., IVANOVIĆ, M., KUZMANOVIĆ, N. AND OBRADOVIĆ, A. 2012. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits, *Pesticides and Phytomedicin*, No. 27: 219–229.
- GEORGE, R. A. 2009. Vegetable seed production, CABI.
- GOTO, M. 1972. Bacterial leaf blight of onion in Japan. *Plant Disease Reporter*, No. 56: 490–493
- HALE, C. N. 1975. Bacteriosis of leeks in New Zealand, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, No. 18: 251-254.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic acids symposium series*, No. 41: 95-98.
- HIRANO, S. S. and UPPER, C. D. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*, *Annual review of phytopathology*, no. 28: 155-177.
- HUGH, R. and LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria, *Journal of Bacteriology*, No. 66: 24-26.
- IKENE, I., GRONDEAU, C., BUREAU, C. and SAMSON, R. 2003. *Pseudomonas* leek blight: study of seed transmission, In *Pseudomonas syringae* and related pathogens (pp. 93-95). Springer, Dordrecht.
- JOANA, G., STEVEN, V. AND ROBERTS, J. 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR, *European Journal of Plant Pathology*, No. 117: 383–392.

- KALUZNA, M., FERRANTE, P., SOBICZEWSKI, P. and SCORTICHINI, M. 2010. Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST, *Journal of Plant Pathology*, No. 92: 781–787.
- KERSTERS, K., LUDWIG, W., VANCANNEYT, M., DE VOS, P., GILLIS, M. and SCHLEIFER, K. H. 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview, *Systematic and Applied Microbiology*, No. 19: 465-477.
- KESHTKAR, A. R., KHODAKARAMIAN, G., and ROUHRAZI, K. 2016. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* which induce leaf spot on walnut, *European Journal of Plant Pathology*, No. 146: 837-846.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G. and LOVREKOVICH, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf, *Phytopathology*, No. 54: 474-477.
- KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyrocyanea* by the oxidase reaction, *Nature*, No. 178: 703.
- KUMAR, S., STECHER, G. and TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular biology and evolution*: msw054.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, No. 227: 680-685.
- LELLIOTT, R. A. 1952. A new bacterial disease of leeks, *Plant Pathology*, No. 1: 84-84.
- LELLIOTT, R. A., BILLING, E. and HAYWARD, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads, *Journal of Applied Microbiology*, No. 29: 470–489.
- LITTLE, E. L., BOSTOCK, R. M. and KIRKPATRICK, B. C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California, *Applied and Environmental Microbiology*, No. 64: 3818–3823.
- LOUWS, F. J., FULBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T. and DE BRUIJN, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, No. 60: 2286–2295.
- LOUWS, F., RADEMAKER, J. and DE BRUIJN, F. 1999. Diversity, detection, and disease diagnosis, *Annual Review of Phytopathology*, No. 37: 81–125.
- MARQUES, A. S., MARCHAISON, A., GARDAN, L. and SAMSON, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group, *Genetics and Molecular Biology*, No. 31: 106-115.
- MOLOTO, V. M., GOSZCZYNSKA, T., DU TOIT, L. J. and COUTINHO, T. A. 2017. A new pathovar of *Pseudomonas syringae*, pathovar *allii*, isolated from onion plants exhibiting symptoms of blight, *European Journal of Plant Pathology*, No. 147: 591-603.
- MORADI-AMIRABAD, Y. and KHODAKARAMIAN, G. 2017. Isolation and characterization of *Erwinia piriflorinigrans* causal agent flower necrosis of red poppy, *Australasian Plant Pathology*, No. 46: 611-616.
- MORADI-AMIRABAD, Y., KHODAKARAMIAN, G. and ZALANDI, H. R. 2017. First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Porri* on onion in Iran, *Journal of Plant Pathology*, No. 99: 539.
- MYUNG, I. S., JOA, J. H. and SHIM, H. S. 2017. Bacterial leaf spot of onion caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*, a new disease in Korea, *European Journal of Plant Pathology*, No. 147: 591-603.
- NOBLE, D. H., COTHER, E. J., HAILSTONES, D. L., FLACK, M., OXSPRING, L. and HALL, B. 2006. Characterisation of *Pseudomonas syringae* strains associated with a leaf disease of leek in Australia, *European Journal of Plant Pathology*, No. 115: 419-430.
- PALLERONI, N. J. 1984. Family I *Pseudomonadaceae*. Genus I *Pseudomonas*. 6 *Pseudomonas syringae*.

- Pages 168-172 in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- PALLERONI, N. J., BALLARD, R. W., ROLSTONE, E., and DOUDOROFF, M. 1972. Deoxyribonucleic Acid Homology Among some *Pseudomonas* species. Journal of Bacteriology, No.110: 1-11.
- PALMER, B.C., and CAMERON, H.R. 1971. Comparison of Plant Pathogenic *Pseudomonas* by Disk Gel Electrophoresis. Phytopathology, No. 61: 984-986.
- RADEMAKER, J. L. W. and DE BRUIJN, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA markers: protocols, Applications and Overviews, 151-171.
- RAHIMIAN, H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae*pv. *syringae* in Iran, Journal of Phytopathology, No. 143: 321-324.
- RAHIMIAN, H. 1991. Bacterial Leaf Spot of Geranium in Mazandaran and Semnan Provinces. Iranian Journal of Plant Pathology, No, 27: 1-12.
- RENICK, L. J., COGAL, A. G., and SUNDIN, G. W. 2008. Phenotypic and genetic analysis of epiphytic *pseudomonas syringae* populations from sweet cherry in Michigan. Plant Disease, No. 92: 372-378.
- ROMBOUTS, S., VAN VAERENBERGH, J., VOLCKAERT, A., BAEYEN, S., DE LANGHE, T., DECLERCQ, B., LAVIGNE, R. and MAES, M. 2016. Isolation and characterization of *Pseudomonassyringae*pv. *porri* from Leek in Flanders, European journal of plant pathology, No. 144, 185-198.
- ROUHRAZI, K. and RAHIMIAN, H. 2012. Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium (Agrobacterium)* spp., Journal of Plant Pathology, No. 94: 555-560.
- ROUMAGNAC, P., GAGNEVIN, L., GARDAN, L., SUTRA, L., MANCEAU, C., DICKSTEIN, E. R. and PRUVOST, O. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, No. 54: 15-24.
- RUDOLPH, K. E. 1995. *Pseudomonas Syringae* Pathovars. In: "Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease." (Ed): Singh, U.S., Elsevier Science, pp. 321.
- SAITOU, N. and NEI, M.1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Molecular biology and evolution, No. 4:406-425.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMSON, R., SHAFIK, H., BENJAMA, A. and GARDAN, L. 1998. Description of the bacterium causing blight of leek as *Pseudomonassyringae*pv. *porri* (pv. nov.),Phytopathology, No.88: 844-850.
- SARKAR, S. F. and GUTTMAN, D. S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonassyringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen, Applied and Environmental Microbiology, No. 70: 1999-2012.
- SAWADA, H., SUZUKI, F., MATSUDA, I. and SAITOU, N. 1999. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae*pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster, Journal of Molecular Evolution, No. 49: 627-644.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B. and CHUN, W. 2001. Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic, third ed, APS Press, Minnesota, 373 pp.
- SERFONTEIN, J. J. 2001. *Xanthomonas* blight of onion in South Africa. Plant Disease, No. 85: 442.
- SUSLOW, T. V., SCHROTH, M. N. and ISAKA, M. 1982. Application of a rapidmethod for gramdifferentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining, Phytopathology, No. 72: 917-918.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. and GIBSON, T. J.1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties

- and weight matrix choice, *Nucleic acids research*, No. 22:4673-4680
- VAN OVERBEEK, L. S., NIJHUIS, E. H., KOENRAADT, H., VISSER, J. and VAN KRUISTUM, G. 2010. The role of crop waste and soil in *Pseudomonas syringae* pathovar *porri* infection of leek (*Allium porrum*), *Applied soil ecology*, No. 46: 457-463.
- VAN CANNEYT, M., TORCK, U., DEWETTINCK, D., VAEREWIJK, M. and KERSTERS, K. 1996. Grouping of pseudomonads by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, No. 19: 556-568.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. and LUPSKI, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Research*, No. 19: 6823-6831.
- VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J. AND LUPSKI, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction, *Methods in Molecular Cellular Biology*, No. 5: 25-40.
- WEINGART, H. AND VOLKSCH, B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50 PCR, *Journal of Phytopathology*, No. 145: 339-345.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. and LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of bacteriology*, No. 173: 697-703.
- YAMAMOTO, S., KASAI, H., ARNOLD, D. L., JACKSON, R. W., VIVIAN, A. and HARAYAMA, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, No. 146: 2385-2394.
- YOUNG, J. M., BRADBURY, J. F., DAVIS, R. E., DICKEY, R. S., ERCOLANI, G. L., HAYWARD, A. C. and VIDAVER, A. K. 1991. Nomenclatural revisions of plant pathogenic bacteria and list of names 1980-1988, *Review of Plant Pathology*, No. 70: 211-221.
- YOUNG, J. M., SADDLER, G. S., TAKIKAWA, Y., DE BOER, S. H., VAUTERIN, L., GARDAN, L. and STEAD, D. E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995, *Review of Plant Pathology*, No. 75: 721-763.