مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۶۵-۲۵۳

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.2.12.1

DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.2.12.1

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2
2023

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

جداسازی و تعیین خصوصیات باکتریوفاژهای آلوده‌کننده *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و ارزیابی کارایی کنترل بیولوژیکی آنها

Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, and evaluating their biological control efficiency

زهرا زائر آناقز[۱]، رضا خاک‌ور[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۲]، حسین بنازاده باقی[۳]

Zahra Zaer Anaqz[1], Reza Khakvar[1], Seyed Abolghasem Mohammadi[2], Hossein Benazadeh Baghi[3]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- گروه ویروس‌شناسی و باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
2. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
3. Department of Virology and Bacteriology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email : نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی *

khakvar@tabrizu.ac.ir and khakvar@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۴)

چکیده

شانکر باکتریایی یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌ها روی درختان میوه هسته‌دار است. این بیماری توسط یک باکتری گرم‌منفی به نام *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ایجاد می‌شود. استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مسی باعث ظهور نژادهای جدید و بروز پدیده مقاومت شده است. یکی از امیدوارترین ترکیبات جایگزین استفاده از باکتریوفاژها است . در این پژوهش ۵۶ نمونه خاک از اطراف درختان میوه هسته‌دار مشکوک به شانکر باکتریایی از شمال‌غرب ایران جمع‌آوری شد. جهت بررسی حضور ذرات فاژی در داخل نمونه‌ها، از روش نقطه‌ای استفاده شد. از روش آگار دولایه-آگار نرم برای خالص‌سازی و تهیه پلاک‌های منفرد فاژی استفاده شد. مجموعاً ۷۵ جدایه فاژی که همگی دارای پلاک شفاف بودند از نمونه‌ها جداسازی شد که از این تعداد، پنج فاژ که بیشترین قدرت لیزکنندگی را داشتند، برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی و مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند. از فاژهای منتخب، پنج فاژ شباهت ریخت‌شناسی به فاژهای خانواده *Myoviridae*، *Tectividae* و *Microviridae* از خود نشان دادند. هرچند هر پنج فاژ در کاهش رشد جمعیت باکتریایی در محیط کشت مایع موثر بودند اما کوکتل تهیه شده از مخلوط پنج فاژ اثر به مراتب شدیدتری از فاژهای انفرادی از خود نشان داد. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که این فاژها به طور موثر باعث کاهش توسعه بیمارگر در داخل گیاه شده و تا ۹۰ درصد می‌توانند علایم ناشی از باکتری را در گیاه کاهش دهند. پنج فاژ منتخب در این تحقیق در آزمایشگاه و در گلخانه نتیجه قابل‌قبولی در کنترل عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار از خود نشان دادند و فرمولاسیون آن‌ها در سطح منطقه قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

دامنه میزبانی،
شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار،
کنترل زیستی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

Bacterial canker is one of the most devastating diseases on the stone fruit trees. This disease is caused by a gram-negative bacterium called *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Consecutive use of antibiotics and copper compounds has caused the emergence of new resistance races. One of the most promising replacement compounds is the use of bacteriophages. In this research, 56 soil samples were collected from the suspected trees of having bacterial canker from northwestern of Iran. In order to check the presence of phage particles, double-layer soft-agar technique was used to purify individual phage plaques. A total of 75 phage isolates, all of which had clear plaques, were isolated from the samples, among them, five phages with the highest lysing capability were selected for electron microscopy and greenhouse studies. Among the selected phages, three phages showed morphological similarity to *Myoviridae*, *Tectividae* and *Microviridae* families. Although all five phages were effective in reducing the growth of bacterial population in liquid culture medium, significant differences were observed between them. The cocktail prepared from the mixture of five phages showed a much stronger effect than the individual phages. The results of the greenhouse tests showed that these phages effectively reduce the development of the pathogen inside the bean and can reduce the bacterial symptoms in the treated plant by 90%. The five isolated phages in this research showed acceptable results in the control of the agent of bacterial canker of the stone fruit trees in the laboratory and in greenhouse experiments, and their actual formulation is recommended at the regional level.

Keywords: biocontrol, host range, bacterial canker of stone fruit trees

مقدمه

درختان میوه هسته‌دار که اغلب بومی مناطق معتدله هستند، متعلق به خانواده گلسرخیان (*Rosaceae*) و جنس آلو (*Prunus*) هستند. این جنس بزرگ شامل گیاهان متعددی مثل هلو، شلیل، آلو، آلوچه ، گیلاس و زردآلو هستند که بصورت پایه و یا زینتی کشت می-شوند (Khodayegan et al., 2013). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار، شانکر باکتریایی است که در تمام مناطق عمده کشت این درختان وجود دارد و به نام‌های بلاست جوانه، بلاست شکوفه، سرخشیدگی، گموز و بلایت سرشاخه نیز شناخته می‌شود (Agrios, 2005). این بیماری یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار می‌باشد که در باغ‌های جوان خسارت آن تا ۷۵ درصد می‌رسد (Agrios, 2005). میوه، برگ‌ها و شکوفه‌ها در تمام سال حساس به این بیماری هستند. آلودگی از طرق زخم‌ها در فصل زمستان رخ می‌دهد و علائم تا فصل بهار قابل رویت نیستند (Huline et al.,2018 a,b). مشخص‌ترین علائم این بیماری، تشکیل شانکر همراه با ترشح صمغ روی شاخه و تنه در فصل بهار است (Agrios, 2005). نواحی آلوده که حالت فرورفته و تیره رنگ دارند و با ترشح صمغ همراه هستند روی شاخه و تنه ظاهر می‌شوند و در نهایت بیمارگر باعث خشک شدن شاخه‌های اصلی و مرگ درخت می‌شود (Huline et al.,2018 a,b). عامل این بیماری یک باکتری گرم منفی بنام *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* است که دارای بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی میزبان می‌باشد (Pinheiro et al., 2019). براساس گزارشات قبلی دو پاتووار *syringae* و *morsprunorum* باکتری *P. syringae* عامل ایجاد آلودگی در درختان میوه هسته‌دار در منطقه آذربایجان می‌باشند (Vasebi et al., 2020). رایج‌ترین روشی که برای کنترل این بیمارگر در باغات کاربرد دارد، استفاده از مشتقات مس مانند اکسید مس (Cu_2O) و آنتی‌بیوتیک‌ها است (Vasebi et al., 2017). با این حال این استراتژی‌ها نیز به طور کامل موثر نیستند، زیرا استفاده مکرر از این ترکیبات باعث ایجاد مقاومت در بیمارگر باکتریایی و تغییر در ساختار جمعیت این بیمارگر شده است. یکی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

از امیدوارکننده‌ترین ترکیبات جایگزین، استفاده از فاژ یا باکتریوفاژ (Bacteriophage, phage) است (Altimira et al., 2012). استفاده از باکتریوفاژها به عنوان عوامل کنترل زیستی دارای مزایای بالقوه‌ای نسبت به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی است. باکتریوفاژها از نظر دامنه میزبانی بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و محدود به یک گونه باکتریایی یا سویه‌های خاص باکتریایی می‌باشند، بنابراین آسیب کمتری به گونه‌های مفید باکتریایی (آنتاگونیست‌ها) در طبیعت وارد می‌کنند، در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها روی طیف وسیعی از باکتری-های بیمارگر و مفید تاثیر می‌گذارند (Hawkins et al., 2010; Park and Nakai 2003) در حال حاضر گزارشات متعددی از کاربردهای عملی فاژها در کنترل بیمارگرهای باکتریایی در بخش کشاورزی ثبت شده است (Bae et al., 2012; Czajkowski et al., 2014). گزارشات متعددی از وجود فاژهای موثر علیه پاتووارهای جنس سودوموناس *P. syringae* به چاپ رسیده است ولی کاربرد عملی از این فاژها برای کنترل این بیمارگر بسیار نادر است (Di lallo et al., 2014; Prior et al., 2003; Qiao et al., 2010; Rombouts et al., 2016; Vidaver et al., 1973; Yin et al., 2019). هدف از این تحقیق جستجوی باکتریوفاژهای اختصاصی موثر علیه سویه‌های مقاوم باکتری بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به آنتی‌بیوتیک و ترکیبات شیمیایی از خاک است و تعیین هویت و فعالیت ارزیابی آن‌ها به گونه‌ای باشد که بتواند آن‌ها را برای کنترل زیستی معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

جدایه باکتریایی و محیط کشت: در این پژوهش از جدایه باکتری بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) strain K26 (KY569176)، که قبلا از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر باکتریایی از زردآلو (عجب شیر، آذربایجان شرقی)، جداسازی و به روش مولکولی با استفاده از دو آغازگر اختصاصی B_1 و B_2 شناسایی شده بود (Vasebi et al., 2019)، به عنوان میزبان باکتریایی برای جداسازی و شناسایی فاژهای اختصاصی استفاده شد. برای کشت باکتری *Pss* استرین K26 از محیط کشت اختصاصی کینگ‌بی (King'B) استفاده شد. همچنین برای کشت شبانه باکتری *Pss* k26 از محیط کشت مایع نوترینت براث (Nutrient broth) استفاده شد.

نمونه‌برداری به منظور جداسازی باکتریوفاژ: به منظور جداسازی باکتریوفاژهای اختصاصی موثر بر باکتری میزبان، نمونه‌برداری در فصل بهار سال های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ از پنج منطقه مختلف استان آذربایجان‌شرقی شامل اسکو، عجب‌شیر، تبریز، مرند و آذرشهر، از عمق ده سانتی‌متری خاک اطراف درختان میوه هسته‌دار شامل آلو، آلبالو، آلوچه، زردآلو، گیلاس و هلو و نیز درخت بادام (از درختان میوه خشکباری) مشکوک به شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

جداسازی ذرات فاژی از خاک: برای جداسازی ذرات باکتریوفاژ از خاک، به میزان ۲۰ گرم خاک از هر نمونه جداگانه وزن و ۴۰ میلی‌لیتر بافر استخراج فاژ Sm buffer (1L ddH_2O, 1M Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl; 10 mM $MgSO_4$) به هر اِرلن حاوی نمونه خاک اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۲ الی ۱۶ ساعت در انکوباتور متحرک با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آن ارلن‌ها به مدت یک ساعت جهت ته‌نشین شدن ذرات ساکن خاک قرار داده شدند. سپس مایع رویی به داخل فالکون‌های استریل ریخته شد و سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از سانتریفیوژ فاز رویی برداشته شد. جهت جداسازی ذرات فاژ از باکتری‌ها و ذرات معلق دیگر، سوسپانسیون بدست آمده از فیلتر سر سرنگی استریل ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. سوسپانسیون حاوی فاژ در درون یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگه داری شد (Slawiak et al., 2009).

مشاهده اثر پلاک ایجاد شده بوسیله باکتریوفاژ روی باکتری میزبان: جهت بررسی حضور ذرات فاژی در داخل سوسپانسیون-های فیلتر شده از روش نقطه‌ای یا لکه‌ای استفاده شد (Akbaba and Ozaktan, 20121; Kudva et al., 1999; Rabiey et al., 2020). ابتدا یک کشت شبانه از باکتری بیمارگر*Pss* در محیط مایع نوترینت براث تهیه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از این محیط کشت که

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

حاوی ۱۰ میکرولیتر از سه یون $10mMCaCl_2$، $MgCl_2$ ، $MgSO_4$ روی پلیت حاوی محیط نوترینت آگار (Nutrient agar) جامد بود، ریخته و پخش شد. پلیت‌ها به مدت یک تا دو ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس جهت سازگاری باکتری با محیط کشت نگه‌داری شدند. پس از این مرحله از سوسپانسیون فاژی حدود ۱۰ میکرولیتر بصورت لکه‌ای روی پلیت ریخته شد. در پلیت شاهد از آب مقطر دو بار استریل در شرایط برابر با پلیت‌های فاژ مورد آزمایش قرار داده شد. ایجاد مناطق لیز شده و پلاک‌های واضح و شفاف روی کشت باکتری به عنوان مثبت بودن تست حضور ذرات فاژی در نظر گرفته شد.

خالص‌سازی فاژ: جهت مشاهده پلاک‌های منفرد فاژی از روش آگار دو لایه-آگار نرم استفاده شد (Bertani, 1951). به این ترتیب که به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت شبانه باکتری میزبان که جمعیت باکتریایی آن به 10^7 cfu/ml تنظیم شده بود، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فاژی در میکروتیوب دو میلی‌متر اضافه شد. برای اتصال بهتر فاژ به سطح سلول‌های باکتریایی۱۰ میکرولیتر محلول یون $MgCl_2$ اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. سوسپانسیون باکتریوفاژ به لوله‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (محیط نوترینت آگار حاوی ۷ گرم بر لیتر آگار) که در دمای ٤٨ درجه سلسیوس از پیش گرم شده بود، انتقال داده شد و پس از مخلوط کردن به سرعت روی پلیت محتوی نوترینت آگار از پیش آماده شده پخش شد. پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پلاک‌ها در صورت ظاهر شدن، از لحاظ مورفولوژی، اندازه و شکل مورد بررسی قرار گرفتند. پلاک‌هایی که شفاف بودند و از نظر شکل و اندازه متفاوت بودند، انتخاب و با استفاده از لوپ استریل به اِرلن حاوی دو میلی‌لیتر بافر استخراج منتقل شدند. سپس جهت آزادسازی فاژ به محیط، ارلن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور متحرک با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای اتاق قرار گرفتند. پس از این مدت محلول جمع‌آوری و سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی بدست آمده جهت خالص‌سازی فاژ فیلتر شد. تمامی این مراحل چهار بار تکرار شد و بعد از چهارمین مرحله محلول بدست آمده مجددا فیلتر شد و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای افزایش غلظت فاژهای خالص شده، نمونه‌ها چندین بار در محیط کشت مایع باکتریایی غنی‌سازی داده شدند. جهت غنی سازی باکتریوفاژها ابتدا کشت تازه‌ای از باکتری بیمارگر در محیط مایع نوترینت براث تهیه شد و جمعیت باکتریایی آن با استفاده اسپکتروفتومتری در OD_{600nm} روی 10^7 Cell/mL تنظیم شد. سپس حدود ۱۰ میکرولیتر از هر سه محلول یون $MCaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4$ ۱۰ به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری میزبان اضافه شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده به ارلن انتقال داده شد. در ارلن شاهد به جای مایع فیلتر شده از ۱ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار استریل استفاده شد. محیط در انکوباتور متحرک با دور ۱۲۰ در دقیقه دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گشت تا باکتری میزبان توسط فاژها مورد عفونت قرار بگیرد و تکثیر بیابند. پس از گذشت زمان ۱۸ ساعت محیط در داخل فالکون جمع‌آوری شد و سانتریفیوژ در دور ٤٠٠٠ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه صورت انجام شد. فاز رویی که حاوی فاژ است جمع آوری شد و از فیلتر ۰/٤٥ میکرومتر عبور داده شد تا خالص شود. سپس جهت افزایش تعداد ذرات فاژها به هر ۱میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده ۲۰ میکرولیتر محلول روی کلرید ($1M\ ZnCl_2$) اضافه شد و به مدت زمان پنج دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. سپس سانتریفیوژ با دور ٥٠٠٠ در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام شد و فاز رویی به عنوان مایع حاوی فاژ برداشته شد (Czajkowski et al., 2019; Czajkowski et al., 2016).

مشاهده فاژ با میکروسکوپ الکترونی عبوری(Transmission electron microscopy**):** نمونه‌ها به منظور مشاهده مورفولوژیکی و تخمین اندازه فاژها به شرکت پرتو رایان رستاک تهران برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی (TEM, 100 kv, Resolution 200) ارسال شدند. قبل از ارسال نمونه‌ها جهت مشاهده ساختمان فاژ، به منظور تکثیر فاژها و افزایش غلظت و تعداد ذرات فاژی، نمونه‌های فاژی به مدت دو هفته غنی‌سازی شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های باکتریوفاژ غلیظ شده با استفاده از استات اورانیل دو درصد رنگ‌آمیزی منفی شدند و روی گرید مسی ٤٠٠ مش قرار گرفتند. تصاویر گرفته شده با فاژهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر به منظور تشخیص خانواده آن‌ها مطابقت داده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

منحنی رشد باکتری همراه با باکتریوفاژ: به منظور بررسی توان کنترلی باکتریوفاژهای جداسازی شده بر کاهش جمعیت باکتریایی میزبان، منحنی رشد باکتری همراه باکتریوفاژ با آلوده‌سازی محیط کشت نوترینت آگار با باکتری میزبان *Pss* برای هر پنج فاژ به طور انفرادی و مخلوطی از فاژها (فاژهای کوکتل) در ساعات مختلف ثبت شد. به لوله‌های فالکون استریل که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت براث بودند، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت شبانه باکتری میزبان *Pss* که جمعیت آن به 10^7 cfu/ml تنظیم شده بود و ۱۰۰ میکرولیتر مایع حاوی فاژ با غلظت بالا اضافه شد. برای شاهد مثبت ۱۰۰ میکرولیتر سوپانسیون باکتریایی بدون اضافه شدن مایع فاژ و برای شاهد منفی ۱۰۰ میکرولیتر مایع فاژ بدون باکتری میزبان در نظر گرفته شد و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور متحرک با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس از زمان صفر (زمان اولیه) تا ٤۸ ساعت، هر دو ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر غلظت نمونه‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد (Pinheiro et al., 2019; Rabiey et al., 2020).

زیست‌سنجی فاژها در شرایط گلخانه بر میزبان لوبیا: جهت بررسی تاثیرات فاژها در شرایط خارج از آزمایشگاه (in vivo)، اثر جدایه‌های فاژی روی گیاه میزبان لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) در پنج تکرار مورد بررسی قرارداده شد. در این طرح پنج گروه تیمار در نظر گرفته شد، گروه اول، گروه تیمارهای انفرادی که با سوسپانسیون باکتری-فاژ (انفرادی)، گروه دوم شامل سوسپانسیون باکتری- مخلوطی از فاژها که به نسبت برابر ترکیب شدند (تیمارکوکتل)، گروه سوم کنترل مثبت که فقط با باکتری میزبان تیمار شد (بدون مه‌پاشی فاژ)، گروه چهارم کنترل منفی (آب مقطر دو بار استریل) و گروه آخر کنترل منفی (فقط مه‌پاشی با محلول فاژ).ابتدا در گلدان‌های پنج اینچی که شامل خاک کمپوست بود بذر لوبیا (رقم ازنا) کاشته شد. هر گلدان شامل پنج تکرار بود. آزمایش در طرح کاملا تصادفی انجام شد. میزبان لوبیا به مدت تقریبی ده روز تا مرحله دو برگی شدن در شرایط گلخانه تحت دمای ۲۲ درجه سلسیوس با دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت و با آبیاری سه روز در هفته قرار داده شد. کشت شبانه‌ای از باکتری میزبان *Pss* در محیط مایع نوترینت براث تهیه شد. سوسپانسیونی با غلظت 10^7cfu/ml تهیه شد. جهت بررسی بهترین عملکرد فاژها در زمانهای مختلف فعالیت بیمارگر، آزمایش در سه طرح تلقیح همزمان (Simultaneously inoculation)، پیشگیری (Prevention inoculation) و مه پاشی فاژ بعد از ایجاد آلودگی (Therapy) انجام شد. جهت اثر بخشی فاژها بر کنترل بیمارگر مه پاشی در هنگام غروب انجام شد. تیمارها مطابق جدول ۱ انجام شدند (Fuji et al., 2010; Nga et al., 2021; Wei et al., 2017) در تیمارهای همزمان، برگ‌های ترد و لطیف میزبان لوبیا با مقدار ناچیزی از پودر خراش‌دهنده (پودر کاربوراندوم) جهت ورود باکتری میزبان خراش داده شدند، سپس سوسپانسیون باکتری روی برگ‌ها به استثنای گروه‌های شاهد منفی مه‌پاشی شدند. دو گروه شاهد منفی بطور جداگانه با محلول فاژ و آب مقطر دو بار استریل مه‌پاشی شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه و خشک شدن برگ‌ها، محلول فاژها و گروه کوکتل (فاژهای مخلوط) با غلظت 10^5-10^6 PFU/ml بر هر گلدان تیمار مه‌پاشی شدند و به مکان تاریک منتقل شدند. گروه شاهد مثبت تنها شامل مه‌پاشی با باکتری میزبان بود.

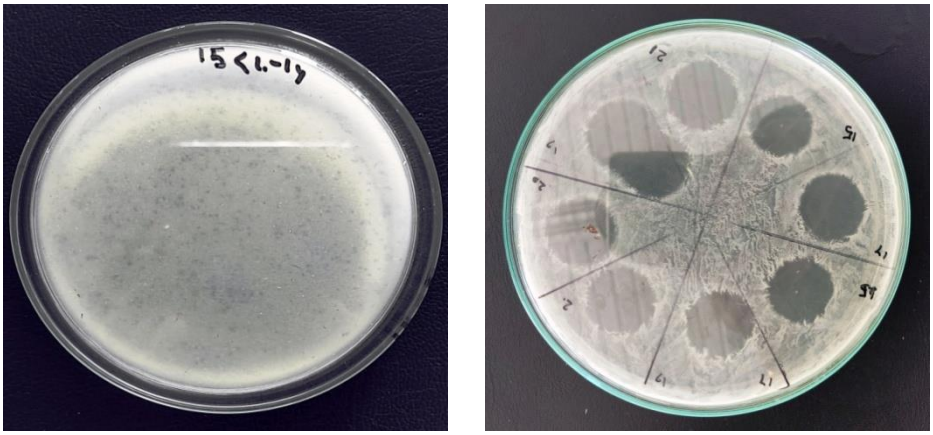
در تیمارهای پیشگیری نیز شرایط انجام آزمایش مانند مرحله‌ی قبلی بود با این تفاوت که ابتدا هر محلول فاژ و گروه فاژهای کوکتل بر روی برگ‌های میزبان هر گلدان بطور جداگانه مه‌پاشی شدند و در یک دوره تاریکی جهت عملکرد موثر فاژها قرار گرفتند. پس از گذشت ٢٤-٤۸ ساعت، پس از ایجاد خراش روی برگ‌ها با سوسپانسیون باکتری میزبان مه‌پاشی شدند. در تیمارهای درمان نیز ابتدا برگ‌های میزبان پس از ایجاد خراش با باکتری میزبان مه‌پاشی شدند و پس از گذشت ٢٤-٤۸ ساعت با محلول فاژ و فاژهای کوکتل اسپری‌پاشی شدند و در مکان تاریک قرار داده شدند. شرایط کنترل مثبت و منفی برای هر سه گروه یکسان بود. گلدان‌ها جهت حفظ رطوبت در داخل یک محفظه پلاستیکی قرار داده شدند. پس از ٢٤ ساعت پوشش برداشته شد. پس از ۷ الی ١٤ روز سطح برگ‌ها بررسی شد و تعداد لکه‌های ظاهر شده بر روی برگ‌ها در هر گلدان ثبت شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

جدول ۱- مراحل مه‌پاشی فاژها بر برگ‌های میزبان لوبیا در شرایط گلخانه

Table 1. Steps of spraying phages suspension on the leaves of bean host in greenhouse conditions

Step	1	2	3
Simultaneously inoculation	Wound formation by carborundum powder on the surface of the leaves	Spraying host bacterial suspension on the leaves	After 30 min, phage suspension was sprayed on the leaves
Prevention inoculation	Spraying phages suspension on the leaves	Wound formation on the surface of the leaves after 24 h	Bacterial suspension was sprayed
Therapy inoculation	Wound formation by carborundum powder on the surface of the leaves	Spraying host bacterial suspension on the leaves	After 24 h. phage suspension was sprayed on the leaves



شکل ۱- اثبات حضور ذرات فاژی **a**) ایجاد پلاک‌های ریز و شفاف فاژهای اختصاصی در روش آگار دو لایه نرم. **b**) لیز شدن چمن باکتری توسط فاژهای اختصاصی به روش نقطه‌ای- لکه‌ای.

Fig 1. Proving the presence of phage particles, a) the presence of small and clear plaques of specific phages in soft top agar technique. b) Lysis of bacteria lawn by specific phages in spot assay technique.

نتایج

جداسازی ذرات فاژی از خاک و اثبات حضور ذرات فاژی:

. پس از جداسازی ذرات فاژی، اثبات فاژ به روش نقطه‌ای- لکه‌ای صورت گرفت. پلاک‌های مربوط به فاژ بصورت شفاف و لیز شده در چمن باکتری در محیط کشت مشاهده شدند (شکل ۱- a). در نمونه‌های خاک تبریز، آذرشهر و مرند، جمعیت‌های موثری از فاژها برای کنترل باکتری میزبان *Pss* مشاهده شد. در نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق اسکو و عجب شیر، باکتریوفاژی مشاهده نشد.

خالص‌سازی باکتریوفاژ

برای جداسازی و خالص‌سازی ذرات منفرد فاژی ازروش آگار دو لایه استفاده شد. در تکنیک آگار دو لایه پلاک‌های منفرد با اشکال و اندازه‌های متفاوت در سطح محیط کشت در چمن باکتری ظاهر شدند (شکل۱- b). پلاک‌هایی که واضح، شفاف و اندازه متفاوتی داشتند، انتخاب و پس از خالص‌سازی در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. مجموعا هفتاد و پنج جدایه فاژی که همگی دارای پلاک‌های شفاف بودند خالص‌سازی شدند.

نتیجه شمارش ذرات فاژها به روش آگار دو لایه

میزان وجود ذرات فاژی برای هر فاژ بر طبق فرمول PFU/ml محاسبه شد. برای شمارش پلاک‌های ایجاد شده در این روش، پلیت‌هایی قابل قبول در نظر گرفته شدند که تعداد پلاک در سطح آن کمتر از ۳۰ و بیشتر از ۳۰۰ عدد نباشد. در رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} در برخی از فاژها به دلیل وجود پلاک‌های زیاد عملا شمارش تعداد ذرات فاژی غیرممکن ارزیابی شد. به همین دلیل عموماً از رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-7} برای محاسبه تعداد پلاک‌های فاژی استفاده گردید. بر اساس نتایج شمارش پلاک، مجموعاً پنج فاژ که بالاترین میزان ذرات فاژی که حاکی از قدرت لیزکنندگی بالای آنها بود برای آزمایشات بعدی انتخاب شد (جدول ۲).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

جدول ۲- آخرین رقت مهار کنندگی ذرات فاژهای منتخب

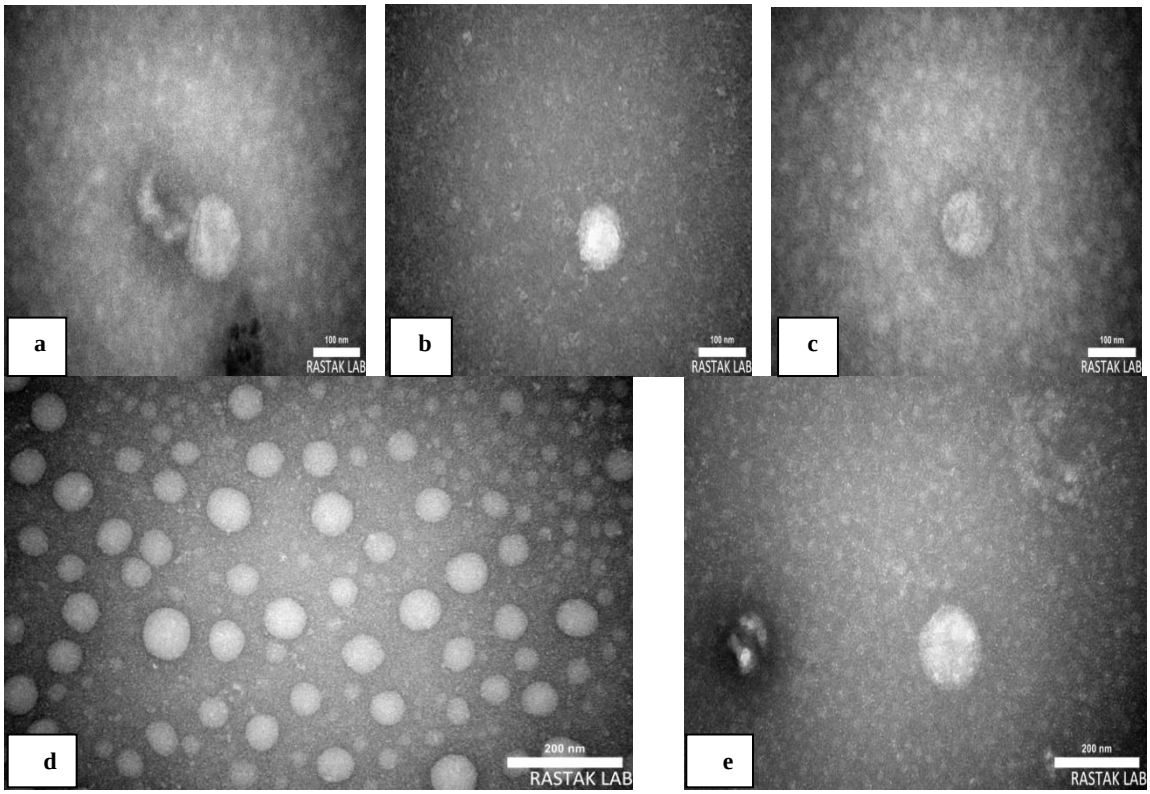
Table 2. The last critical dilution of selected phages particle

Phage	Plaque number	The last critical dilution	Phage particle
MAH-15	73	10^{-6}	$3.65.10^{8}$
AZA-17	32	10^{-7}	$1.60.10^{9}$
AZG-19	55	10^{-6}	$2.75.10^{8}$
AZB-20	46	10^{-7}	$2.30.10^{9}$
AZZ-21	46	10^{-9}	$2.30.10^{11}$

نتیجه تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی

تصاویر پنج فاژ منتخب توسط میکروسکوپ الکترونی عکس-برداری شد. این پنج فاژ بزرگترین و واضح‌ترین پلاک‌ها را تولید و بیشترین کاهش را در جمعیت باکتری ایجاد کرده بودند (شکل۲). فاژ MAH-15 جدا شده از شهرستان مرند، میزبان هلو، دارای سر و دم بلند با اندازه ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که بیشتر شبیه به فاژهای خانواده میوویریده (*Myoviridae*) است. فاژ AZA-17 جدا شده از شهرستان آذرشهر، از میزبان آلوچه به ترتیب دارای پیکره‌های گرد، بدون دم و زوائد پروتئینی کوتاه روی کپسید پروتئینی با اندازه ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که بیشتر شبیه به فاژهای خانواده میکروویریده (*Microviridae*) یا (*Corticoviridae*) می‌باشد. فاژهای AZG-19، AZB-20 و AZZ-21 جدا شده از شهرستان آذرشهر، میزبان گیلاس، بادام و زردآلو، دارای پیکره‌های چندوجهی، بدون دم و زوائد پروتئینی بلندتر روی کپسید خود می‌باشند و با اندازه ۲۰۰ نانومتر که بیشتر شبیه به فاژهای خانواده تکتیویریده (*Tectiviridae*) می‌باشد. با این حال جهت شناسایی و اثبات دقیق آن‌ها شناسایی ژنوم در سطح مولکولی نیاز می‌باشد.

نرخ رشد باکتری میزبان در حضور و در غیاب باکتریوفاژهای جداسازی شده (شکل ۳) نشان داد که در حضور ذرات فاژی از رشد باکتری میزبان تا حد قابل ملاحظه‌ای جلوگیری می‌شود. چگالی نوری برای تعداد سلول‌های باکتریایی در دو ساعت اول در محیط کشت آلوده به باکتری بدون فاژ (شاهد) و در محیط کشت آلوده به باکتری همراه با فاژ یکسان بود و تفاوتی مشاهده نشد.

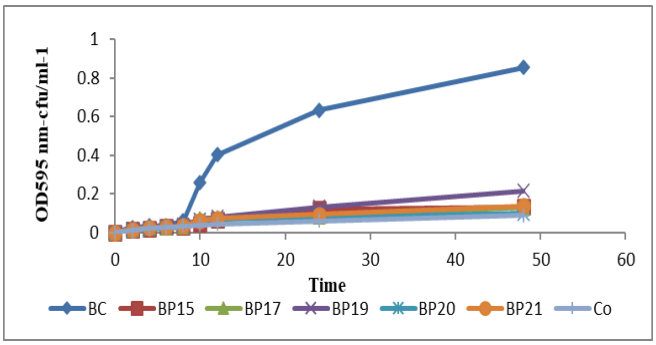


شکل۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی که احتمالا مربوط به a) فاژهای خانواده میوویریده، ۱۰۰ نانومتر. b) فاژهای شبیه به خانواده‌های میکروویریده، ۱۰۰ نانومتر. c, d, e) فاژهای خانواده تکتیویریده، ۲۰۰ نانومتر می‌باشند.

Fig 2. Transmission Electron Microscopy (TEM) images probably related to a) *Myoviridae* family, 100nm. b) *Microviridae* family, 100 nm. c,d and e) *Tectiviridae* family, 200 nm.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

پس از این زمان چگالی نوری محیط کشت تنها حاوی باکتری میزبان (شاهد) در مقایسه با محیط کشت همراه با فاژ در حال افزایش تعداد سلول‌های باکتریایی بود در حالی که کاهش آن در محیط کشت باکتری همراه با فاژ مشاهده شد. چگالی نوری باکتری میزبان بدون فاژ (شاهد) در طول دوره ٤٨ ساعت به 10^{13} cfu/ml افزایش یافت. هر پنج فاژ در کاهش رشد باکتری میزبان موثر بودند اما تفاوت‌های مختلفی در کاهش رشد جمعیت باکتریایی در بین سه گروه فاژی از پنج فاژ وجود داشت. بیشترین تاثیر بر کاهش رشد باکتری میزبان در بین فاژهای فردی توسط فاژ AZB-20بدست آمد. فاژهای MAH-15،AZA-17 و AZZ-21 تفاوتی از نظر تاثیر روی عفونت‌زایی نداشتند و از این لحاظ بر کاهش رشد باکتری میزبان یکسان بودند. در این میان گروه فاژی کوکتل میزان تاثیر بیشتری در کاهش رشد باکتری میزبان داشتند. قابل ذکر است که تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) بین گروه شاهد و گروه فاژهای انفرادی و کوکتل مشاهده شد (معنی‌دار بودن داده‌ها با اطمینان ۹۹ درصد با نرم افزار SPSS، آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد انجام شد).



شکل ۳- منحنی رشد باکتری در میزبان (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss* همراه با باکتریوفاژ بصورت انفرادی و فاژهای کوکتل

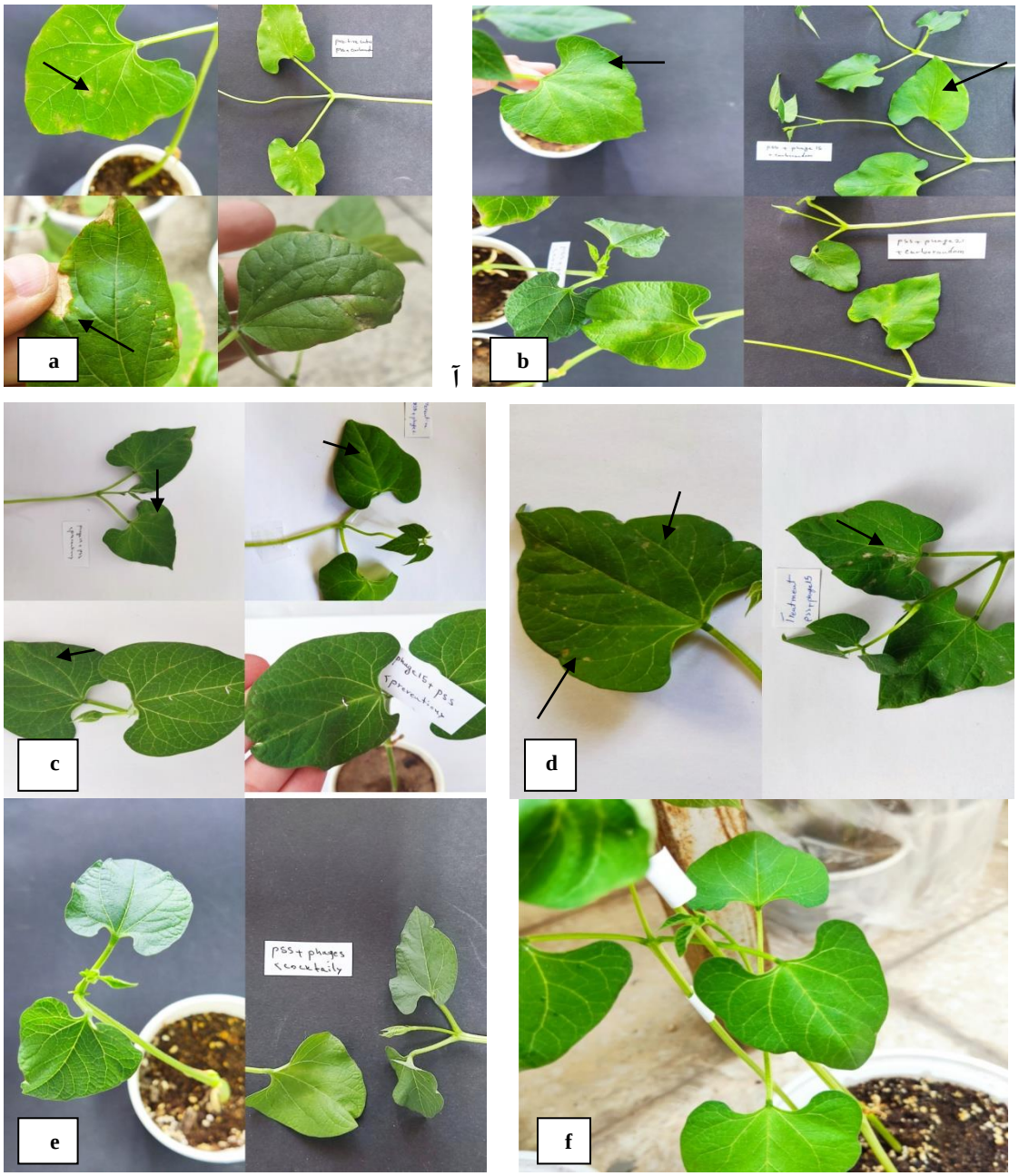
Fig 3. Growth curve of bacterial population of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) with individual phages and cocktail phages

زیست‌سنجی فاژها در شرایط گلخانه

برای فهم اینکه فاژها در کدام مرحله قادر به کاهش بیماریزایی بر میزبان موثر هستند، طرح زیست‌سنجی در سه بخش مه‌پاشی همزمان باکتری بیمارگر- فاژ، پیشگیری و درمان انجام شد. پس از دو هفته بررسی برگ‌های میزبان مه‌پاشی شده، لکه‌های ظاهر شده در سطح برگ‌های تیمار شده با فاژ و تیمار نشده مشاهده، شمارش و یادداشت شد. براساس نتایج، تعداد لکه‌های ظاهر شده در برگ-های تیمار شده با سوسپانیون فاژ کمتر و اندازه لکه‌ها نسبت به برگ‌های تیمار نشده با فاژ (کنترل مثبت) کوچکتر بود. هیچ گونه علائمی در برگ‌های کنترل منفی (مه‌پاشی با آب مقطر و فاژ) مشاهده نشد (شکل چهار، a). در طرح مه‌پاشی همزمان باکتری بیمارگر- فاژ و پیشگیری هر دو باعث کنترل و مهار بیمارگر بصورت موفقیت‌آمیز شدند و حضور فاژ در هر دو طرح، بیماریزایی باکتری را بطور موثر کاهش داد. در طرح مه‌پاشی همزمان، برگ‌های تیمار شده با بیمارگر و فاژها در مقایسه با برگ-های تیمار نشده (کنترل مثبت) به ترتیب (٧٦ درصد) Phage MAH-15، (٨١ درصد) Phage AZA-17، (٧٢ درصد) Phage AZG- 19، (٦٨ درصد)Phage AZB-20 و(٧٥ درصد) Phage AZZ-21 و برگ‌های تیمار شده با بیمارگر و فاژهای کوکتل (٩٠ درصد) باعث کاهش بیماریزایی بیمارگر شدند(شکل ٤، b و e). در طرح پیشگیری نیز برگ‌های تیمار شده با بیمارگر و فاژها در مقایسه با برگ‌های تیمار نشده (کنترل مثبت) به ترتیب (٧٦ درصد) Phage MAH-15، (٧٤ درصد) PhageAZA-17، (٨٣ درصد) Phage AZG-19، (٧٥ درصد)Phage AZB-20 و (٨٢ درصد)Phage AZZ- 21 و برگ‌های تیمار شده با بیمارگر و فاژهای کوکتل (٨٣ درصد) باعث کاهش بیماریزایی بیمارگر شدند (شکل چهار -d). همچنین آنالیز داده‌های هر دو گروه با نرم‌افزار SPSS، آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان داد که بین گروه برگ‌های تیمار نشده با سوسپانسیون فاژ (کنترل مثبت) و برگ‌های تیمار شده با سوسپانسیون فاژ تفاوت معنا داری(p< ۰/۰۵) وجود دارد و هر دو طرح باعث کنترل بیمارگر شدند و میانگین داده‌های دو گروه تفاوت چندان زیادی باهم نداشت، اما تاثیرات فاژهای AZG-19 و AZZ-21 در گروه پیشگیری از نظر تاثیر عملکرد بر بیمارگر موثرتر از گروه همزمان بود. قابل ذکر است مه‌پاشی سوسپانسیون فاژهای کوکتل در هر دو گروه بخصوص گروه همزمان تاثیر بیشتری روی کاهش بیماریزایی بیمارگر نسبت به فاژهای انفرادی نشان دادند (شکل ٥، a ، b و جدول ٣). در مرحله‌ی درمان تعداد لکه‌های ظاهر شده و اندازه‌ی لکه‌ها در سطح برگ‌های تیمار شده با سوسپانسیون فاژ نسبت به دو مرحله‌ی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

همزمان و پیشگیری بیشتر بود، با این حال تفاوت معناداری بین گروه برگ‌های تیمار نشده با سوسپانسیون فاژ (کنترل مثبت) و برگ‌های تیمار شده با سوسپانسیون فاژ مشاهده شد (p<0/05)، اما از نظر تاثیر بر بیماریزایی کمتر از ۳۰ درصد باعث کاهش بیماریزایی شدند که به ترتیب (۲٤درصد) Phage MAH-15، (۱٤ درصد) Phage AZA-17، (۲۸ درصد) Phage AZG-19، (۷ درصد) Phage AZB- 20 و (۲۵ درصد)Phage AZZ-21 و برگ‌های تیمار شده با بیمارگر و فاژهای کوکتل (۳۹ درصد) قرار گرفتند (شکل ٤- ت و شکل ٥- c و جدول۳).



شکل ٤- a) علائم لکه برگی باکتریایی بر برگ‌های گیاه میزبان لوبیا در تیمارهای مختلف مه‌پاشی؛ a) کنترل مثبت (تلقیح شده با سوسپانسیون باکتری به تنهایی)، b) تیمار تلقیح همزمان باکتری و فاژ، c) تیمار پیشگیری، d) تیمار درمان، e)مه‌پاشی با فاژهای کوکتل- در مرحله تلقیح همزمان و f) کنترل منفی (مه‌پاشی با آب).

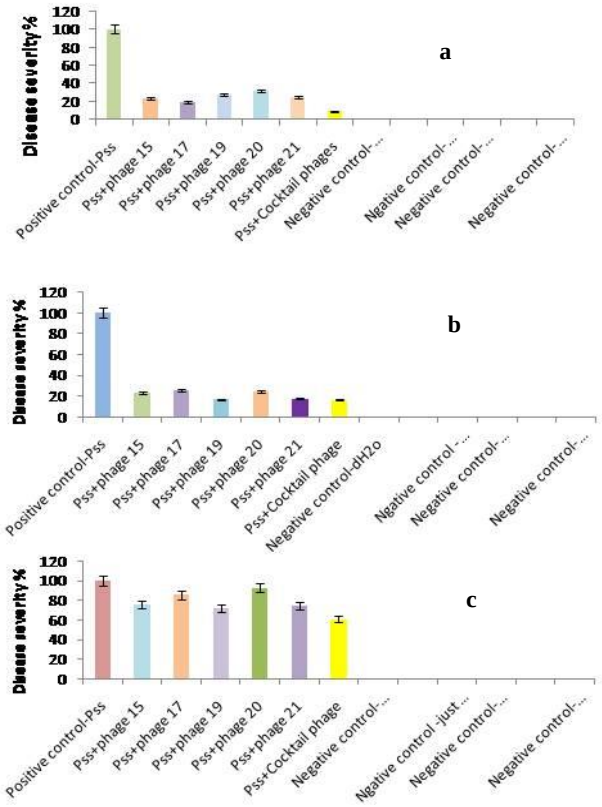
Fig 4. a) Bacterial leaf spot symptoms by different treatment on leaves of bean; a) positive control (inoculated with bacterial suspension), b) simultaneous inoculation stage c) prevention stage d) treatment stage e) sprayed with cocktail phages - in the stage of simultaneous inoculation and f) negative control (sprayed with water).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد لکه‌های ظاهر شده در سه گروه همزمان، پیشگیری و درمان در برگ‌های تیمار شده با سوسپانسیون فاژ و تیمار نشده به عنوان کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری *Pss* با غلظت ۱۰^{7}cfu/mL).

Table 3. Comparison of the average number of spots appearing in three groups: simultaneous, prevention and therapy in leaves treated with phage suspension and untreated as a positive control (*Pss* bacterial suspension with a concentration of 10^{17} cfu/ml).

Factors	Average data of Simultaneous treatments	Average data of prevention treatments	Average data of therapy treatments
Spraying *Pss* bacteria and phage 15	$23.76^{a,b}$	23.67^{b}	$76^{c,d}$
Spraying *Pss* bacteria and phage 17	$19.33^{a,b}$	25.33^{b}	$86^{e,f}$
Spraying *Pss* bacteria and phage 19	$27.33^{a,b}$	17^{b}	72.33^{c}
Spraying *Pss* bacteria and phage 20	$35.33^{a,b}$	24.67^{b}	$93.33^{۳f}$
Spraying *Pss* bacteria and phage 21	$24.67^{a,b}$	17.67^{b}	75.33^{c}
Spraying *Pss* bacteria and cocktail phages	$9.33^{a,b}$	$16.33^{a,b,c}$	61.33^{b}
Positive control -*Pss*	100.67^{c}	100.67^{d}	$100.67^{d,f}$
Negative control-dH2O	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}
Negative control-phage	۰^{a}	۰^{a}	۰^{a}



شکل۵- مقایسه کلی تاثیرات سوسپانسیون فاژها بر توسعه باکتری *Pss* در گیاه میزبان لوبیا در سه مرحله‌ی a) تیمار تلقیح همزمان، b) تیمار پیشگیری و c) تیمار درمان. آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS–دانکن ($p<۰/۰۵$).

Fig 5. A general comparison of the effects of phages suspension on the development of *Pss* bacteria in the bean host plant in three stages: a) simultaneous inoculation treatments, b) prevention treatments and c) therapy treatments. Data analysis with SPSS-Duncan software ($p<0.05$).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

بحث

شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار یکی از مشکلات اساسی در درختان میوه هسته‌دار بخصوص گیلاس در سطح جهانی می‌باشد که باعث از بین رفتن محصولات سالانه می‌شود (Huline et al., 2018(a,b); Spotts et al., 2010). تا به امروز سه پاتووار از *P. syringae*، بنام‌های *Pss*، Psm_1 و Psm_2 به عنوان عوامل اصلی بیماری شناخته شده‌اند (Lie et al., 2015). در چند سال اخیر با ظهور و گسترش پدیده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مسی در میان باکتری‌های بیمارگر دیده شده است که استفاده از باکتریوفاژها سودمند به نظر می‌رسد. اولین مرحله عفونت فاژ، جذب فاژ به سطح سلول باکتری می‌باشد و بستگی به وجود گیرنده در سطح سلول باکتری دارد (Kuvda, 1999). این گیرنده‌ها در سطح سلول باکتری همان لیپوپلی‌ساکاریدهای متفاوت هستند . اضافه کردن نمک‌های مختلف از جمله نمک منیزیوم به اتصال فاژ به سطح سلول باکتری کمک می‌کند، زیرا فاژ برای اتصال نیاز به یون‌های کلسیم و منیزیوم دارد (Calendar et al., 1998). اگر باکتری میزبان لیپوپلی‌ساکارید سطحی خود را از دست بدهد یا دچار تغییر شود دیگر فاژ توانایی اتصال به باکتری میزبان را نخواهد داشت و در نتیجه مقاومت در باکتری میزبان رخ می‌دهد و در محیط کشت پلاک ایجاد نمی‌شود (Mehdizadeh et al., 2008).

در این پژوهش پنج فاژ اختصاصی که توانایی آلوده و هدف گرفتن بیمارگر*Pss* را بطور اختصاصی داشتند، جداسازی و شناسایی شدند. برای اینکه یک فاژ بتواند به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی مطرح و موثر باشد یکی از فاکتورهای مهم و اولیه توانایی آلوده و لیز کردن میزبان باکتریایی می‌باشد که این پنج فاژ پتانسیل بالقوه را به عنوان کنترل بیولوژیکی در کنترل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار نشان دادند. قابل ذکر است که همه این پنج فاژ قادر به ایجاد پلاک‌های شفاف در چمن باکتری میزبان در محیط کشت بودندکه نشان از یک چرخه عفونت لیتیک (Lytic cycle) بود. فاژهایی که دارای چرخه لیتیک باشند خطر انتقال افقی ژن(Horizontal gene) را کاهش می‌دهند (Penades et al., 2015). لیتیک بودن فاژها در کنترل زیستی اهمیت بخصوصی دارد زیرا فاژهای لیزوژنیک (Lysogenic cycle) می‌توانند چرخه زندگی خود را تغییر داده و وارد ژنوم باکتری میزبان شوند. این فاژها باعث انتقال ژن‌های بیماریزایی، ژنهای تولیدکننده توکسین و بروز پدیده مقاومت در باکتری میزبان شده و خطر انتقال و جابجایی ژنوم را افزایش می‌دهند (Boyd et al., 2001; Merril et al., 2003; Walder, 1998)

کارایی این پنج فاژ برای کنترل بیمارگر در سطح برگ‌های میزبان لوبیا به عنوان سیستم مدل مورد بررسی قرار گرفت. عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار باعث ایجاد لکه قهوه‌ای (Brown spot) روی سطح برگ‌های میزبان لوبیا شده و بصورت رورست و وسیع در سطح برگ لوبیا پخش می‌شود. بنابراین میزبان لوبیا به عنوان یک میزبان جایگزین برای این بیمارگر انتخاب شد(Hunter and Legard, 1990). کنترل زیستی بیمارگر بر سطح برگ‌های میزبان لوبیا نشان داده شدکه بیشترین میزان تاثیر کاربرد فاژها در مرحله تلقیح همزمان و پیشگیری بود و کاربرد فاژها بصورت مه-پاشی قبل از ورود بیمارگر بر سطح برگ‌ها باعث کاهش توسعه بیماریزایی و جمعیت بیمارگر تا ۸۰ درصد در هر دو مرحله بود. همچنین کاربرد پنج فاژ بصورت کوکتل بیشترین میزان تاثیر را به همراه داشت اما پس از ورود بیماگر و توسعه آن و سپس مه‌پاشی فاژ بر سطح میزبان (به عنوان مرحله درمان) و کاهش بیماریزایی بسیار ناچیز و کمتر از ۳۰ درصد در فاژهای انفرادی و حدود ۳۹ درصد در فاژهای کوکتل مشاهده شد که برای کاهش بیماریزایی بهتر است فقط بصورت فاژهای کوکتل مورد استفاده قرار بگیرند

از سایر پژوهش‌های موفقیت‌آمیز استفاده از فاژها می‌توان به اثرات مه‌پاشی فاژ QE1337-26 بر عامل بیمارگر آتشک گلابی (*Erwinia amylovora*) بر نهال‌های گلدانی سیب اشاره کرد که باعث کاهش بیماریزایی بیمارگر شده‌اند (Boule et al., 2011). همچنین کاربرد فاژها در شرایط مزرعه‌ای بر عامل بلایت برگی پیاز و گوجه فرنگی (*Xanthomons* sp.) قابل مقایسه با ترکیبات مسی بود که به شدت باعث کاهش بیمارگر و خیلی موثرتر از ترکیبات مسی–مانکوزب بود. همچنین فاژها باعث کاهش علائم بلایت ناشی از سوختگی در تره‌فرنگی با عامل *P.s.* pv. *porri* شدند. با این حال کاربرد فاژها در فیلوسفر نیازمند مطالعه بیشتر است. زیرا اشعه ماورابنفش می‌تواند باعث تخریب ذرات فاژ در بخش‌های هوایی گیاهان شود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

کاربرد فاژها در برگ‌های گوجه فرنگی در اول صبح باعث از بین رفتن آن‌ها یک روز بعد به دلیل نور ماورابنفش شد (Iriarte et al.,2007). مطالعات متعدد نشان داده است که کاربرد فرمول‌های حفاظتی مانند استفاده از پودر شیر خشک برای کاهش اثرات نور ماورابنفش بر جمعیت فاژها موثر بوده است (Balogh et al., 2010). از راهکارهای دیگر می‌توان استفاده از سویه‌های ضعیف بیمارگر که امکان تکثیر فاژ را در غلظت بالا بدون آلوده کردن گیاه فراهم می‌کنند اشاره کرد (Iriate et al., 2012). از کابردهای دیگر موثر فاژ اضافه کردن آنها به طور مستقیم به خاک اطراف ریشه گیاهان (ریزوسفر) است که قابلیت ماندگاری آن‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین کاربرد آنتاگونیست‌ها در کنار فاژها باعث ماندگاری آن‌ها در بخش فیلوسفر گیاه می‌شود (Balogh et al., 2010; Jones et al., 2007). البته این نکته حائز اهمیت است که زمان کاربرد فاژها نقش مهمی در پایداری فاژها دارد. به همین دلیل پیشنهاد می‌شود یا قبل از طلوع آفتاب در صبح یا به هنگام غروب آفتاب استفاده شود. فاژهای جداسازی شده در این پژوهش قادر به کنترل بیولوژیکی شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار بودند با این حال مطالعات بیشتری برای بررسی توانایی فاژها و کاربرد آن‌ها مورد نیاز است و بهتر است برای شناسایی دقیق فاژها از روش‌های مولکولی و تکنولوژی‌های به‌روزتر کمک گرفت.

منابع

Agrios GN. 2005. Plant pathology. Elsevier academic press. Burlington, Ma, USA, 79-103.

Akbaba M, Ozaktan H. 2021. Evaluation of bacteriophages in the biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from cankers on sweet cherry (*Prunus avium* L.) in Turkey. Egyptian Journal of Biological Pest Control 31: 1-1.

Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas LA, Seeger M. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. BMC Microbiology 12: 1-2.

Bae JY, Wu J, Lee HJ, Jo EJ, Murugaiyan S, Chung E, Lee SW. 2012. Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1613-1620.

Balogh B, Jones JB, Iriarte FB, Momol MT. 2010. Phage therapy for plant disease control. Current Pharmaceutical Biotechnology 11: 48-57.

Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 62: 293-300.

Boulé J, Sholberg PL, Lehman SM, O'gorman DT, Svircev AM. 2011. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 33: 308-317.

Boyd E, Davis BM, Hochhut B. 2001. Bacteriophage–bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. Journal of Trends in Microbiology 9: 137-44.

Calendar R (Ed). 2012. The Bacteriophages*:* Volume 1. Springer Science & Business Media.

Czajkowski R, Ozymko Z, Lojkowska E. 2014. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 (‘*D. solani’*). Journal of Plant Pathology 63: 758-72.

Czajkowski R, Ozymko Z, Lojkowska E. 2016. Application of zinc chloride precipitation method for rapid isolation and concentration of infectious *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. lytic bacteriophages from surface water and plant and soil extracts. Journal of Folia Microbiologica 61: 29-33.

Di Lallo G, Evangelisti M, Mancuso F, Ferrante P, Marcelletti S, Tinari A, Superti F, Migliore L, D'Addabbo P, Frezza D, Scortichini M. 2014. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker. Journal of Basic Microbiology 54:1210-21.

Fujie M, Takamoto H, Kawasaki T, Fujiwara A, Yamada T. 2010. Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage ϕRSS1. Journal of Bioscience and Bioengineering 109:153-158.

Hawkins C, Harper D, Burch D, Änggård E, Soothill J. 2010. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. Journal of Veterinary Microbiology 146 :309-313.

Hulin MT, Armitage AD, Vicente JG, Holub EB, Baxter L, Bates HJ, Mansfield JW, Jackson RW, Harrison RJ. 2018. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* reveals convergent gene gain and loss associated with specialization onto cherry (Prunus avium). New Phytologist 219: 672-96.

Hulin MT, Mansfield JW, Brain P, Xu X, Jackson RW, Harrison RJ. 2018. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. Journal of Plant pathology 67: 1177-1193.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]

Iriarte FB, Balogh B, Momol MT, Smith LM, Wilson M, Jones JB. 2007. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. Journal of Applied and Environmental Microbiology 73: 1704-1711.

Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, Jackson LE, Balogh B, Hong JA, Momol MT, Jones JB, Vallad GE. 2012. Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages: two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. Bacteriophage 2: e23530.

Jones JB, Jackson LE, Balogh B, Obradovic A, Iriarte FB, Momol MT. 2007. Bacteriophages for plant disease control. Annual Review of Phytopathology 45:245–62

Khodayegan p, Sedaghati A, Hossein pour A, Baghaei ravi S. 2013. Study on canker disease of stone fruits and antibacterial effects of some plant essentials on its causal agent in Kerman province. Journal of Plant Pathology 48: 303-317.

Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde CJ. 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. Journal of Applied and Environmental Microbiology 65: 3767-3773.

Legard DE, Hunter JE 1990. Pathogenicity on bean of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* recovered from the phylloplane of weeds and from bean crop residue. Journal of Phytopathology 80:938-42.

Li B, Hulin MT, Brain P, Mansfield JW, Jackson RW, Harrison RJ. 2015. Rapid, automated detection of stem canker symptoms in woody perennials using artificial neural network analysis. Journal of Plant Methods 11:1-9.

Mehdizadeh M, Eskandari SO, Zavar M, Piroz B. 2008. The Importance of *Escherichia coli* O157: H7 in Foodborn Infection. Journal of Kerman University of Medical Sciences 15: 353-361.

Merril CR, Scholl D, Adhya SL. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. Journal of Nature Reviews Drug Discovery 2: 489-97.

Nga NT, Tran TN, Holtappels D, Kim Ngan NL, Hao NP, Vallino M, Tien DT, Khanh-Pham NH, Lavigne R, Kamei K, Wagemans J. 2021. Phage Biocontrol of Bacterial Leaf Blight Disease on Welsh Onion Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Antibiotics 10: 517.

Park SC, Nakai T. 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. Journal of Diseases of Aquatic Organisms 53: 33-9.

Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. 2015. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. Journal of Current Opinion in Microbiology 23: 171-178.

Pinheiro LA, Pereira C, Frazão C, Balcão VM, Almeida A. 2019. Efficiency of phage φ6 for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an in vitro preliminary study. Journal of Microorganisms 7:286.

Prior SE, Andrews AJ, Nordeen R O. 2007. Characterization of bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Journal of the Arkansas Academy of Science 61: 84-89

Qiao X, Sun Y, Qiao J, Di Sanzo F, Mindich L. 2010. Characterization of Φ2954, a newly isolated bacteriophage containing three dsRNA genomic segments. Journal of BMC Microbiology 10:1-7.

Rabiey M, Roy SR, Holtappels D, Franceschetti L, Quilty BJ, Creeth R, Sundin GW, Wagemans J, Lavigne R, Jackson RW. 2020. Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. Microbial Biotechnology 13: 142814-45.

Rombouts S, Volckaert A, Venneman S, Declercq B, Vandenheuvel D, Allonsius CN, Van Malderghem C, Jang HB, Briers Y, Noben JP, Klumpp J. 2016. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringa*e pv. *porri*. Frontiers in microbiology 15: 279.

Sławiak M, van Beckhoven JR, Speksnijder AG, Czajkowski R, Grabe G, van der Wolf JM. 2019. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. Journal of European Journal of Plant Pathology 125: 245-261.

Smith A., Zamze SE, Hignett RC. 1994. Morphology and hydrolytic activity of A7, a typing phage of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. Journal of Microbiology 140: 905-913.

Spotts RA, Wallis KM, Serdani M, Azarenko AN. 2010. Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-Infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combinations. Journal of Plant Disease 94: 345-350.

Vasebi Y, Khakvar R, Faghihi MM, Vinatzer B. 2017. Virulence-related syringomycin gene in grouping of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains, the causal agent of canker on apricot and almond trees. Journal of Iranian Journal of Plant Pathology, 53:267-286.

Vasebi Y, Khakvar R, Tian L, Moubarak P, Valentini F, Weisberg AJ, Vinatzer BA. 2020. Phenotypic characterization and phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* strains associated with canker disease on apricot in Iran within the context of the global genetic diversity of the *P. syringae* complex. European Journal of Plant Pathology 158: 545-60.

Vidaver AK, Koski RK, Van Etten JL. 1973. Bacteriophage φ6: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. Journal of virology 11: 799-805.

Waldor MK. 1998. Bacteriophage biology and bacterial virulence. Journal of Trends in Microbiology 6:295-297.

Wei C, Liu J, Maina AN, Mwaura FB, Yu J, Yan C, Zhang R, Wei H. 2017. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. Virologica Sinica 32: 476-84.

Yin Y, Ni PE, Deng B, Wang S, Xu W, Wang D. 2019. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Journal of Acta Agriculture Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science 69: 199-208.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-21]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.22.1]