Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 4, 2025, p. 351-359

Molecular Identification of Gall-forming Bacteria in Stone and Pome Fruits using the *recA* Gene Sequence

K. Farri[1], M. Khezri[2*], M. Abrinbana[3], M. Rastgou[3]

1 and 3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively
2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
(*- Corresponding author's Email: maryamkhezri86@gmail.com)

Received: 11-05-2024
Revised: 15-10-2024
Accepted: 21-10-2024
Available Online: 03-03-2025

How to cite this article:
Farri, K., Khezri, M., Abrinbana, M., & Rastgou, M. (2025). Molecular identification of gall-forming bacteria in stone and pome fruits using the *recA* gene sequence. *Iranian Plant Protection Research*, *38*(4), 351-359. (In Persian with English abstract)
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.88026.1188

Introduction

Crown gall is an economically important plant disease that affects dicotyledonous and a few monocotyledonous plants in orchards, farms, and nurseries, worldwide. The disease is caused by *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) Conn 1942, a Gram-negative bacterium from the family of *Rhizobiaceae* in the class of AlphProteobacteria. This bacterium can survive in the soil as well as within host plants. The key characteristic of this bacterium is its ability to transform regular plant cells into tumor cells. Once this transformation is complete, the cells can continue to grow and divide independently of the bacterium. Molecular methods play a key role in the identification, classification and taxonomy of prokaryotes. Housekeeping genes are highly conserved protein-coding genes used to distinguish between different taxa of bacteria. In this study, the *recA* gene sequence was used to evaluate the efficiency of this gene in identifying and determining the phylogenetic relationships of tumor-forming *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940) Starr & Weiss, 1943 isolates.

Materials and Methods

The pathogenic isolates were obtained from tumors on the branches of cherry, plum, and apple trees in the orchards of Urmia, Naqadeh, Sardasht, and Khoy; located in West Azerbaijan province of Iran. In a previous study, phenotypic identification of the isolates was done, as well as the pathogenicity test with the gall formation on tomato crown. In this study, the *recA* gene sequence of four isolates (AT-U2, AT-K2, AT-N25 and AT-N15) was used for drawing the phylogenetic tree. After DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) was done using 91F/595R primers. Each PCR reaction was performed in a 25 µL PCR cocktail containing 12 µL of Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon, Denmark), 1 µL of each primer (10 pmol μL^{-1}), and 1 µL of template DNA (50 ng). The PCR amplification program was carried out under the following conditions; initial denaturation cycle at 94 °C (5 min), 35 cycles of denaturation at 94 °C (50 sec), annealing at 57 °C (50 sec) and

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.88026.1188

extension at 72 °C (1.5 min), and a final extension at 72 °C for 10 min. The sequences of the studied isolates were compared with the sequences of the reference strains registered in the NCBI database. Sequence of the *recA* gene of *A. tumefaciens* and *A. rubi* strains, as well as strain AOL15 of *Agrobacterium albertimagni* Salmassi *et al.*, 2002, as an outgroup strain, was obtained from GenBank. Phylogenetic relationships were inferred, by applying the Kimura-2-parameter model. The neighbor-joining (NJ) method and the adjacent method by MEGA 11 software were used for the phylogenetic tree and tested by bootstrap analysis with 1000 repetitions.

Results and Discussion

A 462 bp fragment was amplified in all bacterial isolates. Comparison of the *recA* sequence showed similarity of 99.95%-100%, with the reference strains of *A. tumefaciens* in GenBank. In the phylogenetic tree, sequence of the *recA* gene of studied isolates and reference strains of *A. tumefaciens* and *A. rubi* obtained from GenBank were used. The phylogeny tree included two main clads. The first clade included two subclades. AT-U2 placed in the first subclade and AT-K2, AT-N25 and AT-N15 placed in the second one. All the reference strains of *A. tumefaciens* from different countries were placed in the first clade, as well. In the second clade, *A. rubi* was placed separately from *A. tumefaciens* isolates. Currently, the analysis of housekeeping genes sequences is widely used to achieve higher accuracy in the phylogenetic relationships of different bacterial taxa. Among the bacterial conserved genes, sequence of the *recA* gene has been the interest of bacteriologist scientists (Costechareyre *et al.*, 2010). Tumor-forming bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.), rose (*Rosa* sp.), red raspberry (*Rubus idaeus* L.), and cornelian cherry (*Cornus mas* L.) were classified in the *Agrobacterium* genus based on the 16S rRNA gene, but the result of phylogenetic analysis based on *atpD*, *recA*, and *rpoB* showed that some of the studied strains classified in *Agrobacterium rosae* Kuzmanovic *et al.*, 2018, which is close to the species *A. rubi* and *Agrobacterium skierniewicense* (Puławska *et al.*, 2012) Mousavi *et al.*, 2015 (Kuzmanovic *et al.*, 2018). A study of the *recA* gene sequence in 138 strains from 13 *Agrobacterium* species and genomospecies led to the differentiation between *A. tumefaciens*, *Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr, 1990, *A. rubi* and *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar & Jones, 2001 species (Costechareyre *et al.*, 2010). In a multilocus sequencing study using *rpoB*, *recA*, *gyrB*, and *atpD* sequences, *Agrobacterium* isolates from various plants identified as *A. larrymoorei* and *A. rubi* (Mafakheri *et al.*, 2019). The study of housekeeping genes has been proposed not only as a phylogenetic tool to clarify the relationships between prokaryote taxa but also as an alternative to previous methods, such as DNA-DNA hybridization and ITS sequence (Costechareyre *et al.*, 2010). According to our results, *A. tumefaciens* strains were situated in a separated clade from *A. rubi* and *A. albertimagni* strains. Therefore, the *recA* gene sequence is a suitable tool to identify *A. tumefaciens* from other *Agrobacterium* isolates.

Conclusion

Results of the phylogenetic analysis revealed that using the *recA* gene sequence has enough efficiency in differentiating *A. tumefaciens* from *A. rubi* strains. This finding suggests that employing the sequences of the *recA* gene in phylogenetic relationship studies of *Agrobacterium* species provides accurate results in bacterial taxonomy.

Keywords: Crown gall, Housekeeping gene, Taxonomy, Tumorigenic bacteria

پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸ شماره ۴، زمستان ۱۴۰۳، ص. ۳۵۹-۳۵۱

شناسایی مولکولی باکتری‌های مولد گال در درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار با استفاده از توالی ژن *recA*

کیوان فرّی[۱] - مریم خضری[۲*] - مسعود ابرین‌بنا[۳] - مینا راستگو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳۰/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

چکیده

بیماری گال طوقه یکی از بیماری‌های مهم از لحاظ اقتصادی در انواع گیاهان باغی، زراعی و زینتی محسوب می‌شود. باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، عامل بیماری است که می‌تواند به‌صورت غیرفعال در خاک و به‌صورت فعال در گیاه میزبان بقاء یابد. در این مطالعه، از توالی ژن *recA* جهت ارزیابی کارآیی آن در شناسایی و تبارشناسی جدایه‌های گال‌زای دو گونه *Agrobacterium tumefaciens* و *Agrobacterium rubi* استفاده شد. جدایه‌های بیماری‌زای این مطالعه، از گال‌های ایجاد شده روی شاخه‌های درختان گیلاس، آلو و سیب در باغات ارومیه، نقده، سردشت و خوی واقع در استان آذربایجان غربی جداسازی شدند. شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها و آزمون بیماری‌زایی با تشکیل گال روی طوقه گوجه‌فرنگی در مطالعات قبلی انجام شده بود. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای 91F/595R جهت تکثیر ژن *recA* انجام شد. قطعه ۴۶۲ جفت بازی در همه جدایه‌های باکتریایی تکثیر شد. مقایسه توالی ژن *recA* در جدایه‌های باکتری، شباهت ۹۹/۹۵ تا ۱۰۰ درصد را با توالی‌های سویه‌های مرجع باکتری *A. tumefaciens* ثبت شده در بانک ژن نشان داد. در درخت تبارزایی، از توالی ژن *recA* جدایه‌های این مطالعه و سویه‌های مرجع *A. tumefaciens* و *A. rubi* استفاده شد. درخت تبارزایی شامل دو شاخه اصلی بود. جدایه‌های این مطالعه به همراه سویه‌های مرجع *A. tumefaciens* از کشورهای مختلف در شاخه اول که خود شامل دو زیرشاخه بود، قرار گرفتند. در شاخه دوم، سویه‌ای از باکتری *A. rubi* مجزا از جدایه‌های *A. tumefaciens* قرار گرفت. نتایج درخت تبارزایی نشان داد که این ژن، کارآیی کافی در تفکیک باکتری‌های *A. tumefaciens* و *A. rubi* را دارد، به‌طوری‌که سویه‌های باکتری *A. rubi* در شاخه‌ای مجزا از سویه‌های *A. tumefaciens* قرار گرفتند. با توجه به این نتایج، پیشنهاد می‌شود که در شناسایی و بررسی روابط تبارشناسی گونه‌های جنس *Agrobacterium*، از توالی ژن خانه‌داری *recA* استفاده شود تا نتایج دقیق‌تری از موقعیت آرایه‌های این باکتری‌ها به‌دست آید.

واژه‌های کلیدی: آرایه‌بندی، باکتری‌های گال‌زا، ژن خانه‌داری، گال طوقه

مقدمه

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* (Conn 1942)، یک باکتری گرم منفی و هوازی اجباری است که با یک تا شش تاژک محیطی حرکت می‌کند. (Smith & Townsend, 1907) این باکتری بیمارگر گیاهی می‌تواند در خاک و گیاهان میزبان بقاء یابد. پراکنش آن جهانی است و دارای دامنه میزبانی وسیعی در بین گیاهان دولپه و تعداد معدودی از گیاهان تک‌لپه و بازدانگان می‌باشد. باکتری *A. tumefaciens* حامل یک پلاسمید بزرگ القاءکننده گال در سلول‌های گیاهی، موسوم به پلاسمید Ti است (McCarthy *et al.*, 2019; Ferdous *et al.*, 2021; Weisberg *et al.*, 2023). توانایی منحصربه‌فرد این باکتری در انتقال بخشی از پلاسمید Ti به سلول-

۱ و ۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: maryamkhezri86@gmail.com)
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.88026.1188

های گیاهی، آن را به یک ابزار قوی در مطالعات انتقال ژن و به‌نژادی گیاهان تبدیل کرده است (Aliu *et al.*, 2024 *et al.*, 2023;Lim).

طبقه‌بندی گونه‌های *Agrobacterium* در ابتدا بر اساس ویژگی های فنوتیپی باکتری و علائمی که روی گیاهان میزبان ایجاد می کردند، انجام می‌شد. با توسعه روش‌های مبتنی بر داده‌های ژنومی، اطلاعات ژنتیکی بیشتری برای طبقه‌بندی گونه-های *Agrobacterium* مورد استفاده قرار گرفت و منجر به تعریف اصطلاح کمپلکس گونه‌ای (Atsc) *A. tumefaciens* شد که این مجموعه شامل چندین گونه ژنومی است (Vargas Ribera *et al.*, 2024).

روش‌های مولکولی در شناسایی، طبقه‌بندی و تبارزایی سطوح مختلف آرایه‌های پروکاریوت‌ها، نقش کلیدی ایفا می‌کنند. در طول ژنوم باکتری‌ها، توالی‌های متعددی از ژن 16S rRNA می‌تواند وجود داشته باشد. این ژن با طول ۱۵۰۰ جفت باز، دارای سطح مناسبی از توالی‌های حفاظت شده است که قابلیت انتقال افقی هم ندارد (Glaeser & Kampfer, 2015). ژن‌های خانه‌داری، ژن‌های بسیار حفاظت شده و کدکننده پروتئین هستند که در سطح جنس و حتی پایین‌تر از جنس، قدرت تفکیک آرایه‌ها را دارند. در این مطالعات، بخشی از توالی‌های حفاظت شده ژن‌های خانه‌داری در سویه‌های ناشناخته با توالی‌های این ژن‌ها در آرایه‌های مختلف مقایسه شده و برای رسم درخت تبارزایی و درک روابط خویشاوندی آن‌ها استفاده می‌شوند (Glaeser & Kampfer, 2015). بر این اساس، در مطالعه-ای که به‌منظور حل مشکل آرایه‌بندی باکتری‌های بیماری‌زا در جنس‌های *Agrobacterium* و *Rhizobium* انجام شد، تبارشناسی سویه‌های متعلق به این دو جنس بر مبنای توالی‌های ژن 16S rRNA و شش ژن خانه‌داری *rpoB*، *recA*، *glnA*، *gln II*، *atpD* و *thrC* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه-های *Agrobacterium* به‌صورت یک خوشه جداگانه‌ای که اغلب شامل آرایه‌های بیماری‌زای گیاهی بود، در تیره *Rhizobiaceae* قرار گرفتند. باکتری *Agrobacterium vitis* (Ophel & Kerr, 1990) از سایر گونه‌های *Agrobacterium* متمایز و در جنس *Allorhizobuim* گروه‌بندی شد و نام این باکتری به *Allorhizobium vitis* (Ophel & Kerr, 1990) Mousavi *et al.*, 2014 تغییر یافت. باکتری *Rhizobium galegae* نیز به همراه باکتری‌های *Rhizobium vignae* Ren *et al.*, 2011، *Rhizobium huautlense* Wang *et al.*, 1998 و *Rhizobium alkalisoli* Lu *et al.*, 2009 تشکیل خوشه جداگانه‌ای دادند که نماینده یک جنس جدید با نام پیشنهادی *Neorhizobium* بودند (Mousavi *et al.*, 2014).

در ایران نیز جهت تفکیک و شناسایی ۲۹ سویه *Rhizobium* مولد گال روی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) از مقایسه توالی ژن‌های خانه‌داری این سویه‌ها استفاده شده است (Rouhrazi *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای دیگر که با استفاده از توالی ژن خانه‌داری *gyrB* انجام شد، سویه‌های *A. tumefaciens* جدا شده از مزارع چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) شهرستان اقلید واقع در استان فارس، در دو گونه ژنومی متفاوت قرار گرفتند (Mafakheri *et al.*, 2017). همچنین کارآیی چند ژن خانه‌داری دیگر در تفکیک گونه‌های *Agrobacterium* جداسازی شده از گیاهان یک‌ساله، چندساله و زینتی نیز به اثبات رسیده است (Mafakheri *et al.*, 2019).

این مطالعه با هدف بررسی کارآیی توالی ژن *recA* در شناسایی و تبارزایی جدایه‌های باکتری مولد گال جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار در استان آذربایجان غربی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری *A. tumefaciens*

در بهار و تابستان سال‌های ۹۸-۱۳۹۷، از باغات درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار در استان آذربایجان غربی بازدید به‌عمل آمد و از درختان دارای نشانه گال نمونه‌برداری شد. از ۲۰۸ نمونه گال، تعداد ۶۰ جدایه باکتری با پرگنه‌های سفید تا کرم رنگ، محدب و گرد با حاشیه صاف روی محیط کشت *PDA+CaCO₃ 0.5%* جداسازی شد. پس از اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها، شناسایی فنوتیپی با استفاده از آزمون‌های معتبر باکتری‌شناسی گیاهی و شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد و تعداد ۱۹ جدایه به‌عنوان باکتری بیماری‌زای گونه *A. tumefaciens* تعیین شدند (Farri *et al.*, 2023) و در این مطالعه از توالی ژن recA چهار جدایه (AT-U2، AT-K2، AT-N25 و AT-N15) برای ترسیم درخت تبارزایی استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن *recA*

استخراج DNA ژنومی جدایه‌های گال‌زای باکتری *A. tumefaciens*، با استفاده از روش لی و دبور (Li & de Boer, 1995) انجام شد. جهت تکثیر ژن *recA* از یک جفت آغازگر 91F/595R (Mousavi *et al.*, 2014) استفاده شد (جدول ۱). مخلوط PCR در ۲۵ میکرولیتر، با ترکیب ۱۲ میکرولیتر مخلوط آماده واکنش (PCR Master Mix Red-Mgcl₂ 180301-50 (Ampliqon))، ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر و ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو تهیه شد. برنامه حرارتی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای 91F/595R به‌صورت یک چرخه واسرشت-سازی اولیه رشته DNA با دمای ۹۴ °C به‌مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی رشته DNA با دمای ۹۴ °C به‌مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته DNA با دمای ۵۷ °C به‌مدت

۵۰ ثانیه و مرحله بسط رشته DNA با دمای ۷۲ °C به‌مدت یک‌ونیم دقیقه و در نهایت، یک چرخه بسط نهایی با دمای ۷۲ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه بود.

مشاهده و تأیید قطعات ژنومی تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. قطعات تکثیر شده توسط شرکت بایونیر کره جنوبی خالص‌سازی و توالی‌یابی شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه (Mousavi *et al*., 2014)

Table 1- Primers used in this study (Mousavi *et al*., 2014)

Primer name	Primer sequence (5'-3')
91F	TTCGGTAAGGGMTCGATHATG
595R	CGHATCTGGTTGATGAAGATNACCAT

تجزیه تبارزایی

توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Chromas (version 2.5) بررسی شد. دو توالی پیش‌رو و پس‌رو از یک جدایه با هم ترکیب و یک رشته توالی از آن‌ها تهیه شد. توالی جدایه‌های مورد مطالعه، با توالی سویه‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با جستجو در برنامه BLAST مقایسه شدند. در ترسیم درخت تبارزایی از توالی ژن *recA* از سویه‌های مرجع *A. tumefaciens*، *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940) Starr & Weiss, 1943 و نیز توالی سویه AOL15 از گونه *Agrobacterium albertimagni* Salmassi *et al*., 2002 به‌عنوان توالی‌های خارج‌گروه اخذ شده از بانک ژن استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی با استفاده از روش Neighbor joinig و مدل Kimura 2-parameter model در نرم‌افزار (version 11) MEGA انجام شد (Tamura *et al*., 2021). در تمامی تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی، مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بیماری گال طوقه از بیماری‌های مهم گیاهان زراعی، باغی و زینتی محسوب می شود که در میزبان‌های مختلف از جمله درختان میوه هسته‌دار، درختان میوه دانه‌دار، مو (*Vitis vinifera* L.)، چغندرقند و گیاهان زینتی در کشور گزارش شده است (Shahabi ; ; Mafakheri *et al*., 2017Mohammadabadi *et al*., 2012 ;Farri & Khezri, 2021). در این پژوهش، کارآیی توالی‌های حفاظت شده ژن *recA* در شناسایی و روابط تبارزایی باکتری *A. tumefaciens* مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه، از توالی ژن *recA* مربوط به جدایه‌های باکتری *A. tumefaciens* استفاده شد. این جدایه‌های بیماری‌زا، از گال‌های ایجاد شده روی شاخه‌ها و تنه درختان گیلاس (*Prunus avium* L.)، آلو (*Prunus domestica* L.) و سیب (*Malus domestica* L. Borkh) جداسازی شده بودند (جدول ۲).

جدول ۲- میزبان، محل و زمان نمونه‌برداری جدایه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens*

Table 2- Host, location and sampling time of *Agrobacterium tumefaciens* isolates

Isolate code	Host	Sampling location	Year
A. tumefaciens AT-U2	Apple	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U6	Apple	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U9	Apple	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U18	Sweet cherry	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U22	Sweet cherry	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U31	Sweet cherry	Urmia	2018
A. tumefaciens AT-U37	Plum	Urmia	2019
A. tumefaciens AT-U46	Plum	Urmia	2019
A. tumefaciens AT-N3	Apple	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-N15	Apple	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-N21	Apple	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-N25	Plum	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-N27	Plum	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-N50	Sweet cherry	Naghadeh	2018
A. tumefaciens AT-S5	Apple	Sardasht	2019
A. tumefaciens AT-K2	Sweet cherry	Khoy	2018
A. tumefaciens AT-K9	Sweet cherry	Khoy	2018
A. tumefaciens AT-K23	Plum	Khoy	2018
A. tumefaciens AT-K28	Plum	Khoy	2018

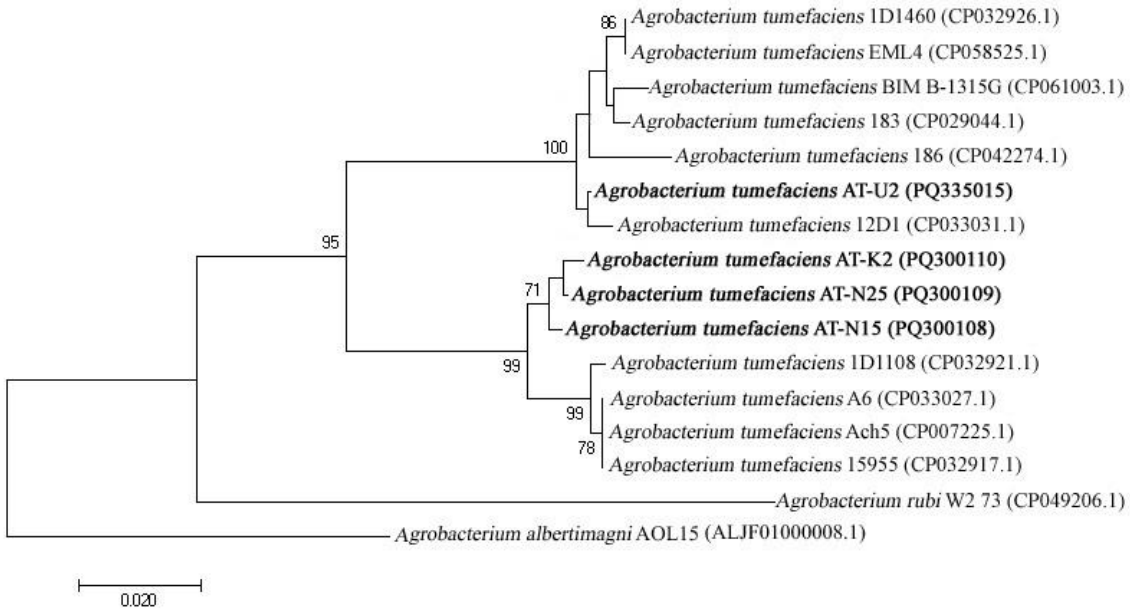
در PCR با استفاده از جفت آغازگر 91F/595R، قطعه ۴۶۲ جفت بازی مربوط به ژن *recA*، در تمامی جدایه‌های باکتریایی تکثیر شد. شماره جدایه‌های *A. tumefaciens* مورد استفاده در درخت تبارزایی و شماره دسترسی آن‌ها در بانک ژن، براساس توالی ژن *recA*، در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه توالی ژن *recA* در جدایه‌های مختلف این مطالعه، قرابت بین ۹۹/۵۹ درصد تا ۱۰۰ درصد را با توالی‌های سویه‌های مرجع باکتری *A. tumefaciens* ثبت شده در بانک ژن نشان داد.

جدول ۳- شماره دسترسی جدایه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در بانک ژن براساس توالی ژن *recA*

Table 3- Accession number of *Agrobacterium tumefaciens* isolates based on the *recA* gene sequence in GenBank

Isolate code	Accession number	Isolate code	Accession number
A. tumefaciens AT-U2	PQ335015	*A. tumefaciens* AT-N15	PQ300108
A. tumefaciens AT-K2	PQ300110	*A. tumefaciens* AT-N25	PQ300109

در درخت تبارزایی ترسیم شده بر مبنای توالی‌های ژن *recA*، چهار جدایه این مطالعه به همراه سویه‌های مرجع *A. tumefaciens* از کشورهای مختلف در شاخه اول که خود شامل دو زیرشاخه بود، قرار گرفتند (شکل ۱). جدایه AT-U2 به همراه سویه‌های *A. tumefaciens* 1D1460، *A. tumefaciens* EML4، *A. tumefaciens* BIM B.1315G، *A. tumefaciens*183، *A. tumefaciens* 186 و *A. tumefaciens* 12D1 در یک زیرشاخه و جدایه‌های AT-K2، AT-N25 و AT-N15 به همراه سویه‌های *A. tumefaciens* 1D1108، *A. tumefaciens* A6، *A. tumefaciens* Ach5 و *A. tumefaciens* 15955 در شاخه اول گروه‌بندی شدند. در شاخه دوم، سویه‌ای از باکتری *A. rubi* به‌تنهایی قرار گرفت و از جدایه‌های *A. tumefaciens* این مطالعه و سویه‌های مرجع اخذ شده از بانک ژن مجزا شد. سویه *A. albertimagni* AOL15 نیز به‌عنوان سویه خارج‌گروه در نظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱- درخت تبارزایی حاصل از تجزیه توالی ژن *recA* جدایه‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* با روش Neighbor Joining. سویه *Agrobacterium albertimagni* AOL15 به‌عنوان آرایه خارج‌گروه در نظر گرفته شد.
مقدار اعتبارسنجی محاسبه شده برای ۱۰۰۰ تکرار نشان داده شده است.

Figure 1- Neighbor-joining phylogenetic tree of the *recA* gene from *Agrobacterium tumefaciens* isolates. *Agrobacterium albertimagni* AOL15 was used as an outgroup strain.
Bootstrap values were calculated from 1000 replicates.

از بین ژن‌های باکتری که دارای توالی حفظ‌شده هستند، توالی ژن *recA* بسیار مورد توجه محققان بوده است. در سال ۲۰۱۰، یک پایگاه اطلاعاتی از توالی ژن *recA* برای کلیه ژنوموارهای گونه کمپلکس *A. tumefaciens* تشکیل شد. طول این ژن، ۴۸۶ جفت‌باز

بوده و جایگاه آن روی ژنوم سویه *A. tumefaciens* 1D1460 در موقعیت نوکلئوتیدی 1533919-1533434 است. بررسی توالی ژن *recA* در ۱۳۸ سویه از ۱۳ گونه یا گونه ژنومی *Agrobacterium*، منجر به تشخیص گونه‌های *A. tumefaciens*، *A. vitis*، *A. rubi* و *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar & Jones, 2001 شد (Costechareyre *et al.*, 2010). مقایسه توالی این ژن در سویه‌های مختلف گونه کمپلکس *A. tumefaciens*، برتری ژن *recA* را نسبت به توالی‌های ITS در شناسایی این سویه‌ها نشان داده است (Costechareyre *et al.*, 2010). در این راستا، محققان از توالی‌های تلفیق‌شده ژن‌های خانه‌داری *atpD*، *recA* و *rpoB* نیز برای تشکیل درخت تبارزایی قوی‌تر و تفکیک بهتر سویه‌ها استفاده کرده‌اند.

در پژوهشی، یک سویه *Agrobacterium* جداسازی شده از رز (*Rosa* sp.) و چهار سویه جداسازی شده از گال‌های مو، تمشک (Rubus idaeus *L.*) و زغال‌اخته (Cornus mas *L.*) با استفاده از روش‌های آرایه‌بندی چندفازی توصیف شدند (Kuzmanovic *et al.*, 2018). در تبارزایی براساس ژن 16S rRNA، همه سویه‌ها در جنس *Agrobacterium* طبقه‌بندی شدند، امّا نتیجه تبارزایی براساس بخشی از ژن‌های خانه‌داری *atpD*، *recA* و*rpoB* نشان داد که چهار سویه مورد مطالعه، یک گونه جدید در جنس *Agrobacterium* با نام پیشنهادی *Agrobacterium rosae* Kuzmanovic *et al.*, 2018 را تشکیل می‌دهند که با گونه‌های *A. rubi* و *Agrobacterium skierniewicense* (Puławska *et al.*, 2012) Mousavi *et al.*, 2015 کمترین فاصله را دارد و سویه تیپ آن نیز NCPPB 1650 می‌باشد (Kuzmanovic *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای دیگر، توالی‌یابی بخشی از ژن‌های خانه‌داری *atpD*، *glnA*، *gyrB*، *recA* و *rpoB* دو سویه بیماری‌زا KFB330 و KFB335 جدا شده از گال روی تمشک در صربستان و یک سویه غیربیماری‌زای AL51.1 جدا شده از گال روی آلو در لهستان منجر به این پیشنهاد شد که این سه سویه به‌عنوان نماینده گونه جدیدی تحت عنوان *Agrobacterium arsenijevicii* Kuzmanovic *et al.*, 2015 با سویه تیپ KFB330 باشند (Kuzmanovic *et al.*, 2015).

تبارزایی براساس توالی ژن‌های 16S rRNA، *atpD* و *recA*، منجر تفکیک و شناسایی سویه‌های چند گونه *Rhizobium* مولد گال روی گیاه لوبیا شد (Rouhrazi *et al.*, 2016). مطالعه تبارزایی با استفاده از توالی‌یابی ژن خانه‌داری *gyrB* مشخص کرد که سویه‌های *A. tumefaciens* جدا شده از مزارع چغندرقند شهرستان اقلید واقع در استان فارس، متعلق به مجموعه بیووار یک بودند که در دو گونه ژنومی متفاوت G3 و G7 قرار گرفتند. در این مطالعه همچنین مشخص شد که هیچ تشابه تبارزایی در بین سویه‌های مجموعه گونه *A. tumefaciens* جدا شده از میزبان‌های انجیر (*Ficus carica* L.)، هلو (*Prunus Persica* L. Batch)، رز و چغندرقند وجود ندارد (Mafakheri *et al.*, 2017). در پژوهشی، تعداد ۴۳ جدایه باکتری از گال طوقه گیاهان مختلف در ایران جداسازی شد. با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PGF/PGR، تعداد ۱۰ جدایه به‌عنوان *Allorhizobium vitis* (*A. vitis*) شناسایی شدند. تعداد ۳۳ جدایه باقی‌مانده، با روش تجزیه توالی چند جایگاه ژنی و با استفاده از توالی چهار ژن خانه‌داری *rpoB*، *recA*، *gyrB* و *atpD* مورد مطالعه قرار گرفتند. از این تعداد، هفت جدایه به گونه *A. larrymoorei* و یک جدایه به گونه *A. rubi* تعلق داشتند (Mafakheri *et al.*, 2019). در مطالعه حاضر نیز نتایج حاصل از درخت تبارزایی با استفاده از ژن *recA* نشان داد که توالی این ژن، کارآیی لازم در تفکیک جدایه‌های مولد گال *A. tumefaciens* جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار را از سویه‌های گونه *A. rubi* دارد.

در حال حاضر، تجزیه و تحلیل توالی ژن‌های خانه‌داری، برای رسیدن به دقت و وضوح بالاتر در روابط تبارزایی گونه‌های درون یک جنس و جنس‌های درون یک تیره کاربرد وسیع دارد. در حقیقت، مطالعه ژن‌های خانه‌داری نه‌تنها به‌عنوان یک ابزار تبارزایی برای پشتیبانی و شفاف‌سازی روابط بین آرایه‌های پروکاریوت‌ها پیشنهاد شده است، بلکه به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های پیشین، از قبیل دورگ‌گیری DNA-DNA و توالی ITS، در توصیف گونه‌ها به‌صورت گسترده استفاده می‌شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، ژن *recA* کارآیی لازم برای شناسایی و تفکیک سویه‌های باکتری *A. tumefaciens* از سویه‌های باکتری *A. rubi* را دارد و از توالی آن می‌توان در شناسایی و بررسی روابط تبارزایی باکتری‌های مولد گال درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار استفاده نمود تا سویه‌ها با دقت بالاتر تشخیص داده شده و موقعیت صحیح آرایه‌های آن‌ها تعیین شود.

References

1. Aliu, E., Ji, Q., Wlazlo, A., Grosic, S., Azanu, M.K.,Wang, K., & Lee, K. (2024). Enhancing *Agrobacterium*-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1429353. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1429353.
2. Bouzar, H., & Jones, J.B. (2001). *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic Microbiology*, *51*, 1023-1026. https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1023.
3. Conn, H.J. (1942). Validity of the genus Alcaligenes. *Journal of Bacteriology*, *44*, 353-360.

https://doi.org/10.1128/jb.44.3.353-360.1942.
4. Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y., & Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microbial Ecology*, *60*, 862-872. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7.
5. Hildebrand, E.M. (1940). Cane gall of brambles caused by Phytomonas n. sp. *Journal of Agricultural Research*, *61*, 685-696. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27485-z.
6. Farri, K., & Khezri, M. (2021). Integrated management method of plant crown gall disease. *Plant Pathology Science*, *10*, 116-127. https://doi.org/10.2982/PPS.10.2.116. (In Persian with English abstract)
7. Farri, K., Khezri, M., Abrinbana, M., & Rastgou, M, (2023). Identification of bacterial agents involved in tumor formation on plum, sweet cherry and apple trees. *Applied Entomology and Phytopathology*, *90*, 171-181. https://doi.org/10.22092/jaep.2023.359240.1446. (In Persian with English abstract)
8. Ferdous, M.L., Hossain, M.N., Ali, M.O., Islam, M.S., & Yasmin, S. (2021). Morphological, biochemical and molecular identification of the wild strain of *Agrobacterium tumefaciens* from crown gall infected mango tree. *Fundamental and Applied Agriculture*, *6*, 43-49. https://doi.org/10.5455/faa.136134.
9. Glaeser S.P., & Kampfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, *38*, 237-245. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007.
10. Kuzmanovic, N., Puławska, J., Prokic, A., Ivanovic, M., Zlatkovic, N., Jones, J.B., & Obradovic, A. (2015). *Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology*, *38*, 373-378. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.001.
11. Kuzmanovic, N., Pulawska, J., Smalla, K., & Nesme, X. (2018). *Agrobacterium rosae* sp. nov., isolated from galls on different agricultural crops. *Systematic and Applied Microbiology*, *41*, 191-197. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.004.
12. Li, X., & de Boer, S.H. (1995). Selection of primers for polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection *Clavibacter michiganensis* subsp. sepidonicus. *Phytopathology*, *85*, 837-842. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-837.
13. Lim, S., Chun, S.C., & Kim, J.W. (2023). Cultivar resistance of Korean breeding cut-rose against crown gall by *Agrobacterium tumefaciens* evaluated by an *in vitro* inoculation. *Plant Pathology Journal*, *39*(2), 220-227. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2022.0095.
14. Lu, Y.L., Chen, W.F., Li, L. H, Wang, E.T., & Chen, W.X. (2009). *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *International Journal of Systematic Microbiology*, *59*, 3006-3011. https://doi.org/10.1099/ijs.0.007237-0.
15. Mafakheri, H., Taghavi, S.M., Banihashemi, Z., Osdaghi, E., & Jay Ram, L. (2017). Pathogenicity, host range and phylogenetic position of *Agrobacterium* species associated with sugar beet crown gall outbreaks in Southern Iran. *European Journal of Plant Pathology*, *147*, 721-730. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1034-3.
16. Mafakheri, H., Taghavi, S.M., Pulawska, J., de Lajudie, P., Lassalle, F., & Osdaghi, E. (2019). Two novel genomospecies in the *Agrobacterium tumefaciens* species complex associated with rose crown gall. *Phytopathology*, *109*, 1859-1868. https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0178-R.
17. McCarthy, R.R., Yu, M., Eilers, K., Wang, Y.C., Lai, E.M., & Filloux, A. (2019). Cyclic di-GMP inactivates T6SS and T4SS activity in *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Microbiology*, *112*, 632-648. https://doi.org/10.1111/mmi.14279.
18. Mousavi, S.A., Osterman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Ludovic, V., Paulin, L., de Lajudie, P., & Lindstorm, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *37*, 208-215. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007.
19. Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., & Lindstrom, K. (2015). Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiolog*, *38*, 84-90. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003.
20. Ophel, K., & Kerr, A. (1990). *Agrobacteriurm vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacteriurm* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *40*(3), 236-241. https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-236.
21. Puławska, J., Willems, A., De Meyer, S.E., & Sule, S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Systematic and Applied Microbiology*, *35*(4), 215-220. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.03.001.
22. Starr, M.P., & Weiss, J.E. (1943). Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagine medium. *Phytopathology*, *33*, 314-318. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09379.
23. Ren, da W., Chen, W.F., Sui, X.H., Wang, E.T., & Chen, W.X. (2011). *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *International Journal of Systematic Microbiology*, *61*, 580-586. https://doi.org/10.1099/ijs.0.023143-0.
24. Rouhrazi, K., Khodakaramian, G., & Velazquez, E. (2016). Phylogenetic diversity of rhizobial species and

symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(5), fnw024. https://doi.org/10.1093/femsle/fnw024.

25. Salmassi, T.M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Newman, D.K., & Hering, J.G. (2002). Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiology Journal*, *19*, 53-66. https://doi.org/10.1080/014904502317246165.
26. Shahabi Mohammadabadi, M., Taghavi, M., & Djavaheri, M, (2012). Phenotypic and genotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates from different hosts in Fars and Kohgiluye and Boyerahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *48*, 329-341. (In Persian with English abstract)
27. Smith, E.F., & Townsend, C.O. (1907). A plant-tumour of bacterial origin. *Science*, *24*, 671e3. https://doi.org/10.1126/science.25.643.671.
28. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*, 3022-3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.
29. Vargas Ribera, P.R., Kim, N., Venbrux, M., A´ lvarez-Pe´rez, S., & Rediers, H. (2024). Evaluation of sequence-based tools to gather more insight into the positioning of rhizogenic agrobacteria within the *Agrobacterium tumefaciens* species complex. *PLoS ONE*, *19*(11), e0302954. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302954.
30. Wang, E.T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X.H., Dorado, O., & Chen, W.X. (1998). Martinez-Romero E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*, 687-699. https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-687.
31. Weisberg, A.J., Wu, Y., Chang, J.H., Lai, E.M., & Kuo, C.H. (2023). Virulence and ecology of Agrobacteria in the context of evolutionary genomics. *Annual Review of Phytopathology*, *61*, 1-23. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-125009.