بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی مهندسی کشاورزی- بیماری شناسی گیاهی (باکتری‌شناسی)

عنوان

شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در خوی و مرند با استفاده از روش rep-PCR

استاد راهنما
دکتر رضا خاک‌ور

استادان مشاور
دکتر مهدی ارزنلو
دکتر ناصر مهنا

پژوهشگر
زکیه روحانی

بهمن 1390 شماره: 132

.

تقدیم به دو ستون استوار زندگی‌ام: پدر و مادرم

پدرم، که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه‌ی زندگی، ایستادگی را تجربه کنم.

و به مادرم، دریایی بیکران فداکاری و عشق، که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم، همه مهر

وبه **همسرم**:

اسطوره‌ی زندگی‌ام، پناه خستگی‌ام و امید بودنم، که وجودش شادی بخش و صفایش مایه‌ی آرامش من است.

سپاس بیکران پروردگار یکتا را، که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش ، رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش، مفتخرمان ساخت.

اکنون در آستانه‌ی راهی نو،به پاس نعمات بی‌حد پروردگار، بر خود لازم می‌دانم، سپاس گذار عزیزانی باشم که یاریم کردند.

اعتراف می‌کنم که نه زبان شکر تو را دارم ، نه توان تشکر از بندگان تو را ، و اما برحسب وظیفه، از کلیه‌ی اساتید ارجمندم در طول سال‌های به یاد ماندنی شاگردی‌شان تشکر می‌نمایم، از جناب آقای دکتر خاک-ور، به‌جهت راهنمایی‌های ارزشمند و کمک‌های بی-دریغشان در طول این پایان نامه، نهایت تشکر را دارم، همچنین از اساتید ارجمند آقایان دکتر مهدی ارزنلو و دکتر ناصر مهنا برای مشاوره و هدایت این پایان‌نامه و از جناب آقای دکتر اسداله بابای اهری به جهت تقبل بازخوانی و زحمت داوری این پایان‌نامه تشکر می‌کنم.

از مدیر محترم گروه گیاه‌پزشکی، استاد فرزانه و گران-قدر، جناب آقای دکتر غلامرضا نیکنام، کمال سپاس-گذاری را دارم.

و در ابتدا و انتهای هر کلامی، تشکر می‌کنم از همسر مهربانم،خانواده‌ی خود و همسرم، که صبورانه در دوران تحصیل همراه و مشوق من بودند و در این راه از هیچ کوششی فروگذاری نکردند و بر دستان پر مهرشان بوسه می‌زنم.

و به رسم ادب و احترام از دوستان و همکلاسی‌های عزیزم خانم‌ها:شهین صبحی، مینا حمیدی، آیلار شبگیری، معصومه غلامی و سیما خدایی و آقایان افشین رستمی و علی احمدی که خاطرات شیرین دوران تحصیل را با من تقسیم کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایم و در پایان سپاس‌گذار تک تک عزیزانی هستم که به نحوی در انجام این پایان‌نامه یاریگر من بودند.

نام خانوادگی: روحانی **نام**: زکیه

عنوان پایان نامه: شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در خوی و مرند با استفاده از روش rep-PCR

استاد راهنما: دکتر رضا خاک‌ور

استادان مشاور: دکتر مهدی ارزنلو – دکتر ناصر مهنا

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته**: مهندسی کشاورزی- گیاهپزشکی **گرایش**: بیماری‌شناسی گیاهی

دانشگاه: تبریز **دانشکده**: کشاورزی

تاریخ فارغ التحصیلی: بهمن 1390 **تعداد صفحات**: 108

کلید واژه: (*Pss*) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، شانکر باکتریایی، تنوع ژنتیکی، rep-PCR، درختان میوه هسته‌دار

چکیده

باکتری (*Pss*) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* یکی از عوامل مهم بیماری‌زای گیاهی بوده که باعث بروز شانکر، لکه برگی و سرخشکیدگی در درختان میوه هسته‌دار می‌شود و خسارت قابل توجهی به این درختان وارد می-کند. طی این تحقیق، در سال‌های 1390-1388 از برخی باغات درختان میوه هسته‌دار مناطق مختلف شهرستان‌های خوی (خوی و فیرورق) و مرند (مرند، کشکسرای و پیام) و تبریز بازدید صورت گرفت و نمونه‌هایی از بافت‌های آلوده‌ی برگ، تنه، شاخه و سرشاخه های دارای علائم شانکر درختان میوه و مشکوک به بیماری جمع آوری شد. در مجموع 285 جدایه‌ی باکتریایی جمع آوری شد، که از بین آن‌ها 53 جدایه بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، آزمون بیماری‌زایی و وجود ژن *syrB* به عنوان نمونه‌ی مثبت جداسازی شدند. تمامی جدایه‌های *Pss* قطعه‌ی 752 جفت بازی را با آغازگر *syrB* تکثیر نمودند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *Pss*، DNA ژنومی استخراج و در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با روش rep-PCR و با آغازگرهای REP1R، REP2، ERIC1R، ERIC2 و BOXA1R مورد استفاده قرار گرفتند. محصول‌های تکثیر شده، با الکتروفورز روی ژل آگارز 1/5 درصد تفکیک شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای با آغازگرهای مذکور، نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه 68 درصد، به شش گروه اصلی (F, E, D, C, B, A) تفکیک شد. گروه اول (A) فقط شامل جدایه‌ی شاهد بود، که از گندم جداسازی شده بود. گروه دوم (B) شامل سه جدایه از مرند، چهار جدایه از خوی و یک جدایه از فیرورق بود. گروه سوم (C) شامل تمامی جدایه‌های کشکسرای به همراه بقیه‌ی جدایه‌های مرند بود. گروه چهارم (D) شامل جدایه‌های خوی و فیرورق بود. گروه پنجم (E) فقط شامل جدایه‌های پیام و گروه ششم (F) فقط شامل جدایه‌های تبریز بود. داده‌های حاصل از روش rep-PCR توانست، جدایه‌های *Pss* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار را، بر اساس منطقه از هم تفکیک کند. تجزیه‌ی واریانس مولکولی داده‌ها نیز، نشان داد که تفاوت ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌هاست. نتایج، نشانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا، درون جدایه‌های *Pss* جداسازی شده از میزبان‌های مختلف درختان میوه هسته-دار در مناطق متفاوت بود.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	2
فصل اول: بررسی منابع	7
1-1- درختان میوه هسته‌دار	8
1-2- بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار	9
1-3- خصوصیات باکتری جنس *Pseudomonas*	9
1-4- شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی	11
1-4-1- خصوصیات بیوشیمیایی پاتوار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	13
1-4-2- خصوصیات باکتری شناسی پاتوار*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	15
1-4-3- موقعیت تاکسونومیکی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	15
1-5- ساختار ژنومی *Pseudomonas syringae*	16
1-5-1- ساختار ژنومی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	16
1-5-2- حضور پلاسمید در *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	17
1-6- علایم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار	17
1-6-1- آلودگی جوانه	19
1-6-2- آلودگی گل	19
1-6-3- آلودگی برگ	20
1-6-4- آلودگی میوه	20
1-7- دامنه‌ی میزبانی	22
1-7-1- چرخه ی بیماری	22
1-8- فعالیت هسته یخی در *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	24
1-8-1- عوامل موثر در فعالیت باکتری‌های مولد هسته یخ	25

1-9- فیتوتوکسین‌های تولید شده توسط *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 26
1-10- تخصص میزبانی در *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 27
1-11- لزوم بررسی تنوع ژنتیکی 28
1-11-1- بررسی تنوع ژنتیکی در *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 29
1-11-2- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از صفات فنوتیپی 30
1-11-2-1- روش‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و سرولوژیکی 30
1-11-2-2- آزمون‌های بیماری‌زایی و تولید سرینگومایسین 31
1-11-3- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از روش‌های مولکولی 33
1-11-3-1- نشانگر rep-PCR 34
1-11-3-2- بررسی تنوع ژنتیکی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با استفاده از rep-PCR 36

فصل دوم: مواد و روش‌ها 41
2-1- نمونه برداری 42
2-2- جداسازی باکتری 42
2-3- خالص سازی جدایه‌ها 43
2-4- نگهداری جدایه‌ها 43
2-4-1- نگهداری جدایه‌ها در آب مقطر استریل 43
2-4-2- نگهداری جدایه‌ها در پتری حاوی محیط کشت 44
2-5- آزمون بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برای شناسایی جدایه‌ها 44
2-5-1- آزمون فوق حساسیت بر روی توتون 44
2-5-2- آزمون زیست سنجی تولید توکسین 45
2-6- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها 45
2-6-1- مایه زنی باکتری بر روی برگ 46
2-6-2- مایه زنی باکتری بر روی سرشاخه‌های جوان 46

2-7- استخراج DNA ژنومی جهت استفاده در PCR 47
2-7-1- بررسی کمیت DNA استخراج شده 48
2-7-2- بررسی خلوص DNA استخراج شده 48
2-7-3- رقیق سازی DNA استخراج شده 49
2-8- شناسایی مولکولی جدایه‌ها 49
2-8-1- شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی 49
2-8-1-1- انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز PCR با ژن *syrB* 50
2-8-1-2- بررسی وجود آلودگی در واکنش PCR 52
2-9- الکتروفورز محصولات PCR 53
2-10- واکنش REP-PCR ، BOX-PCR و ERIC-PCR 53
2-11- مواد ومحلول‌های مورد استفاده برای استخراج، PCR و الکتروفورز DNA 55
2-11-1- محلول 0/5 مولار EDTA (PH=8) 55
2-11-2- تهیه بافر TBE (5X) 55
2-11-3- تهیه‌ی اتیدیوم بروماید 56
2-11-4- بافر بارگیری 56
2-11-5- نشانگر اندازه (مارکر) 57
2-12- آنالیز داده‌ها، امتیازدهی به باندها و رسم درخت فیلوژنی 57
2-13- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) 58

فصل سوم: نتایج وبحث 59
3-1- جداسازی جدایه‌ها 60
3-2- خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیولوژیکی جدایه‌ها 61
3-3- آزمون بیماری‌زایی 63
3-4- آزمون فوق حساسیت بر روی توتون 65
3-5- تولید توکسین در جدایه‌های باکتریایی 65

3-6- نتایج حاصل از استخراج DNA ژنومی جدایه‌های *Pss* 66
3-6-1- نتایج حاصل از تعیین کیفیت DNA استخراج شده 66
3-7- شناسایی جدایه‌ها با پرایمر اختصاصی ژن *syrB* 67
3-8- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از روش rep-PCR 68
3-8-1- تنوع ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از REP-PCR 68
3-8-2- تنوع ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR 71
3-8-3- تنوع ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ERIC-PCR 74
3-8-4- آنالیز داده‌های حاصل از REP-PCR، BOX-PCR و ERIC-PCR 77
3-9- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها 79
3-10- تفکیک جدایه‌های مورد مطالعه براساس جمعیت 83
3-10- 1- محاسبه تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها 85
3-11- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) 86
3-12- بحث 88
3-13- نتیجه گیری 95
3-14- پیشنهادات 96
منابع 98

جدول1-2- برخی خصوصیات بیوشیمیایی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 14
جدول2-1- توالی و نام آغازگر اختصاصی ژن *syrB* 50
جدول2-2- مواد لازم و مقدار هر یک برای تهیه محلول پایه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز 51
جدول2-3- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگر *syrB* 52
جدول2-4- آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش REP-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR 54
جدول2-5- برنامه‌ی حرارتی برای انجام واکنش REP-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR 54
جدول3-1- مشخصات جدایه‌های بدست آمده از درختان میوه هسته‌دار 61
جدول3-2- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pss* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار 63
جدول3-3- مقدار ویژه، درصد واریانس هر مولفه و درصد واریانس تجمعی مولفه‌های حاصل از تجزیه به مختصات اصلی 81
جدول3-4- جمعیت‌ها و جدایه‌های مربوط به آن‌ها براساس منطقه‌ی جداسازی 83
جدول3-5- تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس شاخص Nei با احتساب اریبی 85
جدول3-6- تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس شاخص Nei بدون احتساب اریبی 86
جدول3-7- داده‌های حاصل از تجزیه واریانس مولکولی 87

شکل2-1- علایم بیماری *Pss* روی درختان میوه هسته‌دار 21
شکل3-1- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *Pss* 62
شکل3-2- آزمون اثبات بیماری‌زایی روی برگ زردآلو 64
شکل3-3- آزمون اثبات بیماری‌زایی روی سرشاخه‌ی هلو 64
شکل3-4- آزمون فوق حساسیت بر روی برگ‌های توتون 65
شکل3-5- تولید توکسین در جدایه‌های باکتری و ایجاد ممانعت از رشد قارچ 66
شکل3-6- نمونه‌ای از DNA استخراج شده از جدایه‌های *Pss* 67
شکل3-7- تکثیر قطعه‌ی 752 bp با آغازگر اختصاصی ژن *syrB* 67
شکل3-8- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از روش REP-PCR با استفاده از آغازگرهای REP1R و REP2 69
شکل3-9- دندروگرام بدست آمده از 53 جدایه *Pss* بدست آمده از درختان میوه هسته‌دار به همراه نمونه‌ی شاهد، مربوط به ارتباط ژنتیکی، میان الگوی اثر ژنتیکی حاصل از REP-PCR 70
شکل3-10- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از روش BOX-PCR با استفاده از آغازگر BOXA1R 72
شکل3-11- دندروگرام بدست آمده از 53 جدایه *Pss* بدست آمده از درختان میوه هسته‌دار به همراه نمونه‌ی شاهد، مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر ژنتیکی حاصل از BOX-PCR 73
شکل3-12- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از روش ERIC-PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 75
شکل3-13- دندروگرام بدست آمده از 53 جدایه *Pss* بدست آمده از درختان میوه هسته‌دار به همراه نمونه‌ی شاهد، مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR 76
شکل3-14- دندروگرام بدست آمده از 53 جدایه *Pss* بدست آمده از درختان میوه هسته‌دار به همراه نمونه‌ی شاهد، مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر ژنتیکی حاصل از REP-PCR ، BOX-PCR و ERIC-PCR 78

شکل3-15- پراکنش دوبعدی جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* براساس دو مختصات اصلی اول 82
شکل3-16- پراکنش سه بعدی جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* براساس سه مختصات اصلی اول 82
شکل3-17- دندروگرام رسم شده توسط نرم افزار POPGENE با استفاده از روش UPGMA 84
شکل3- 18- پراکنش جدایه های *Pss* بر اساس سه مولفه اصلی با استفاده از نرم افزار Genealex 85
شکل3-19- نمودار درصد واریانس مولکولی 87

مقدمه

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) یکی از پاتوارهای مهم باکتری *Pseudomonas syringae* است که دارای دامنه‌ی میزبانی وسیع بوده و در بیش از 180 گونه‌ی گیاهی از جنس‌های متفاوت از جمله درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار، حبوبات، نیشکر، گندم، برنج و گیاهان زینتی ایجاد بیماری کرده و خسارت وارد می‌کند (برادبری، 1986).

Pss عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار است، که در تمامی مناطق اصلی پرورش درختان میوه در دنیا شیوع دارد. خسارت اصلی این بیماری، بیشتر روی درختان میوه هسته‌دار است که از مشکلات اصلی و محدود کننده‌ی احداث باغات میوه هسته‌دار می‌باشد (تومیدس و همکاران، 2005 ;سولیکوفسکا و سوبیزفسکی، 2008). این بیماری تقریبا در تمامی مناطق عمده‌ی کشت درختان میوه وجود دارد و به عنوان عامل گموز، بلاست شکوفه، مرگ سرشاخه، سرخشکیدگی، بلایت جوانه و مهمیز شناخته شده است (اشکان، 1381). از نظر خسارت اقتصادی یکی از مهمترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار به شمار می‌رود و باعث ایجاد 10 الی 75 درصد خسارت در باغ‌های میوه‌ی جوان می‌شود (اگریوس، 2005). این بیماری در استان‌های خراسان، مرکزی، گلستان، مازندران، تهران، آذربایجان شرقی و غربی و همچنین کردستان از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و همه ساله خسارت-های جبران ناپذیری را به درختان میوه وارد می‌سازد (قاسمی، 1385)، خسارت حاصل از این بیماری می‌تواند در نتیجه‌ی سرمازدگی شکوفه‌ها یا مرگ جوانه و گل‌ها، زوال درخت و توسعه‌ی شانکرها افزایش پیدا کند (هوانگ و همکاران، 2005).

عدم آشنایی باغداران با این بیماری، و همچنین نحوه‌ی کنترل نسبتا مشکل آن، از جمله مهمترین عوامل افزایش خسارت و نابودی درختان بر اثر ابتلا به این بیماری گزارش شده است (قاسمی، 1385). علائم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار به سن درخت، رقم میزبان، نوع اندام گیاهی آلوده، سویه‌ی بیمارگر، نوع پایه، نوع منبع آلودگی، عملیات زراعی و شرایط محیطی بستگی

دارد، مهمترین مشخصه‌ی این بیماری که همیشه مشهود نبوده و یا در تمامی میزبان‌ها دیده نمی‌شود، ایجاد شانکر به همراه ترشح صمغ است (هاتینگ و همکاران، 1995).

سه پاتوار گونه از *Pseudomonas syringae* می‌تواند عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار باشد:

1. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall که ممکن است عامل شانکر باکتریایی بر روی ارقام تجاری درختان میوه هسته‌دار باشد.

2. *P. syringae pv. morsprunorum* (Wormald) Young *et al.*. که بیشتر به درختان گیلاس، آلبالو و آلو حمله می‌کند.

3. *P. syringae* pv. *persicae* که باعث بیماری لکه برگی، شانکر، گموز هلو در فرانسه و زوال باکتریایی در شلیل، هلو و آلوی ژاپنی در نیوزلند می‌شود (اشکان، 1381) .

هر سه پاتوار جزء باکتری‌های گرم منفی و میله‌ای کشیده به ابعاد 1/5×1/2-0/7 میکرومتر و متحرک با دو یا چند تاژک قطبی هستند (حمزه نژاد، 1382). اکثر پاتوارهای *Pseudomonas syringae* در محیط KB[1] پس از گذشت 72 ساعت در دمای 26 درجه سانتی‌گراد فلورسنت بوده و کلونی‌های دایره‌ای شکل با حاشیه‌ی کامل یا بریده بریده با سطح برآمده، یا فرورفته، صاف و درخشان که در حضور نور شیشه‌ای به نظر می‌رسند، تولید می‌کنند (حمزه نژاد، 1382).

پاتوارهای *Pseudomonas syringae* در توانایی ایجاد بیماری روی گیاهان مختلف و نوع علائم ایجاد شده بر روی آن‌ها و تولید فیتوتوکسین‌ها، با همدیگر تفاوت دارند. وجود این نوع تنوع فنوتیپی و فیزیولوژیکی گسترده که ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی بین پاتوارهای *P. syringae* است، بیانگر این است که هیچ رابطه‌ای بین بیماری‌زایی و ویژگی‌های فنوتیپی وجود ندارد که بوسیله‌ی آن‌ها بتوان

[1] King B

پاتوارها را به سادگی از هم تفکیک کرد (وین گارت و ولکس، 1997). مطالعه‌ی *Pss* به منظور شناخت دقیق‌تر عامل بیماری‌زا و همچنین درک رابطه‌ی بین پاتوژن و میزبان حائز اهمیت است. تمام جدایه‌های *Pss* به لحاظ آزمون‌های سرولوژیکی و بیوشیمیایی دارای شباهت‌های بالایی هستند (سیرویلری و همکاران، 2005)، با این وجود، به نظر می‌رسد که نوعی تخصص میزبانی و به دنبال آن نوعی تنوع ژنتیکی، بین جدایه‌های مختلف این باکتری وجود داشته باشد که آزمون‌های بیوشیمیایی رایج، قادر به تشخیص آن‌ها نیستند (کلرک و همکاران، 1998).

توصیف تنوع جدایه‌ها و تعیین دامنه‌ی میزبانی *Pss* در انجام بهتر قرنطینه‌های گیاهی، انتخاب ارقام برای مقاومت، برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک، تشخیص گروه‌های جدایه‌ها و مطالعه‌ی ارتباط بین آن‌ها دارای اهمیت زیادی است (کاکو، 2003).

با گسترش روز افزون استفاده از روش‌های مولکولی، تشخیص و طبقه‌بندی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی دچار دگرگونی و تغییر شده است. بر اساس توالی‌های کاملا حفظ شده، نیمه حفظ شده و کاملا متغیر باکتریایی، آغازگرهایی طراحی شده‌اند، که در تشخیص و تفکیک جدایه‌های باکتریایی کاربرد دارند (هایوارد، 1996). آنالیز مولکولی ژنوم باکتری‌ها، قابلیت این را دارد که، تفاوت-های زیرگونه‌ای را به خوبی مشخص کند، یکی از این روش‌ها، انگشت نگاری اختصاصی با استفاده از روش rep-PCR می‌باشد، که از توالی‌های REP بعنوان آغازگر استفاده می‌شود (ورسالوویک و همکاران، 1991)، توالی‌های تکراری DNA که به‌طور طبیعی و دست نخورده در ژنوم باکتری‌ها پراکنده هستند، می‌توانند به عنوان جایگاهی برای تکثیر DNA ژنومی به کار روند. سه گروه از توالی-های تکراری به‌نام‌های REP, ERIC, BOX در ژنوم باکتری‌ها وجود دارد که با طراحی آغازگرهایی بر اساس این توالی‌های تکراری پروتکول‌هایی تحت عنوان ERIC-PCR, BOX-PCR, REP-PCR ارائه شده است، که منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنوم می‌گردد و الگوی ژنومی به‌دست آمده از این

روش‌ها، باعث تولید و تمایز قطعاتی با اندازه‌های مختلف DNA ژنوم اختصاصی جدایه می‌گردد، که به عنوان بارکد برای هر جدایه‌ی خاص بکار می‌رود (لاوس و همکاران، 1994).

با توجه به اهمیت باکتری *Pss* و امکان وجود تخصص میزبانی و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های این باکتری و از آن‌جا که تفکیک و تمایز جدایه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی امکان پذیر نمی-باشد (ویسنت و روبرتس، 2007)، لذا، شناخت عامل بیماری، تعیین خصوصیات و تنوع فنوتیپی و زیست‌شناسی و تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی به خصوص rep-PCR، می‌تواند در ارائه‌ی تدابیر مناسب و کاربردی جهت کنترل این بیماری بسیار تاثیرگذار باشد.

مدیریت بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران، یک چالش همیشگی برای باغداران و متخصصین توسعه، به ویژه محققین بوده است و از آن‌جا که بدون شناخت دقیق عامل بیماری، مدیریت مبارزه با آن مشکل خواهد بود، بررسی و شناخت دقیق هر عامل، از نکات مهم و ضروری در بیماری‌شناسی گیاهی به شمار می‌آید، لذا این تحقیق به منظور بررسی دقیق شناخت خصوصیات و تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های باکتری *Pss* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در شهرستان‌های خوی(خوی و فیرورق)، مرند(کشکسرای، مرند و پیام) و تبریز انجام پذیرفت، امید آن‌که نتایج حاصل از این تحقیق، بتواند در ارائه‌ی راه‌کارهای مناسب جهت مدیریت و کنترل بیماری موثر واقع گردد.

فصل اول

بررسی منابع

1-1- درختان میوه هسته‌دار

درختان میوه هسته‌دار متعلق به خانواده‌ی گل‌سرخیان، زیرخانواده‌ی بادامیان و جنس آلو هستند. این جنس بزرگ شامل هلو، شلیل، آلو، آلبالو، زردآلو، بادام، گیلاس، گوجه سبز و گونه‌های زیادی هستند. اغلب این محصولات، بومی مناطق معتدله هستند که برای شکستن رکود، به زمستان سرد نیاز دارند و سالانه میوه تولید می‌کنند، از آن‌جایی‌که گونه‌های درختان میوه هسته‌دار در سراسر دنیا پخش است، ژنوتیپ‌هایی برای سازگاری با مناطق حاشیه‌ای و حتی آب و هوای محلی توسط کشاورزان و محققان انتخاب شده است. تعدادی از ارقام که به صورت محلی انتخاب می‌شوند، میوه‌ی آن‌ها اغلب از نظر تجارتی کیفیت قابل قبولی ندارند. مناطق دارای زمستان ملایم شامل بخش‌هایی از دنیا هستند که جزء مناطق بسیار مهم تولید هسته‌دارها می‌باشند، شرایط آب و هوایی در این محل‌ها برای تولید هسته‌دارها ایده‌آل می‌باشد (راحمی، 1389).

دمایی که جوانه‌ی درختان میوه‌های هسته‌دار در آن از سرما خسارت می‌بینند به مراحل اولیه‌ی نمو آن‌ها بستگی دارد. گل‌ها و میوه‌ها نیز اغلب به دماهای بین ^{0}c 2-3 حساس بوده و خسارت می‌بینند (راحمی، 1389). با توجه به جمعیت روز افزون کشور و صادرات این محصولات به کشورهای غربی و حوزه‌ی خلیج فارس ضروری است در جهت توسعه‌ی باغ‌ها و افزایش این محصولات برنامه ریزی اصولی صورت گیرد، یکی از این روش‌ها افزایش محصولات باغی، جلوگیری از خسارت عوامل بیماری‌زا و آفات در باغ‌ها می‌باشد.

1-2- بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار

شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار بوسیله‌ی پاتوارهای مختلف *Pseudomonas syringae* ایجاد می‌شود. علائم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار به سن درخت، رقم میزبان، نوع