بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه مازندران

دانشکده مهندسی زراعی

پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد در رشته مهندسی‌گیاهپزشکی

گرایش بیماری شناسی گیاهی

موضوع:

بررسی جایگاه تاکسونومیکی جدایه های شبه *Pseudomonas viridiflava* عامل بلاست مرکبات

استاد راهنما:

دکتر حشمت اله رحیمیان

استاد مشاور:

دکتر محمد علی تاجیک قنبری

دانشجو:

رقیه شریفی

دی ماه ۱۳۸۸

سپاسگزاری

از تمامی معلمان، اساتید، دوستان و خانواده گرامی ام در طی دوران تحصیل تشکر می نمایم.

تقدیم به:

تمامی عزیزانی که در پیمودن طریق علم و دانش به مـن یـاری نمودند.

چکیده

با توجه به اهمیت بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور و خسارت شدیدی که برخی از سال‌ها به اندام-های رویشی و زایشی وارد می‌کند، بررسی بیماری و عامل آن ضروری به نظر می رسد. به منظور بررسی تنوع باکتری عامل طی سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۷ از بافت های دارای علائم بلاست در باغات مختلف مرکبات اطراف ساری، نمونه برداری انجام گرفت. با کشت نمونه ها بر روی آگار مغذی ۶۳ جدایه انتخاب و آزمون های تکمیلی بر روی آنها انجام گرفت. بر اساس منفی بودن واکنش اکسیداز، عدم هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان، واکنش متفاوت در لهانیدن ورقه های سیب زمینی، ایجاد فوق حساسیت روی شمعدانی و توتون جدایه‌ها به عنوان *Pseudomonas viridiflava* شناسایی شدند. جدایه ها کاتالاز تولید نموده و ژلاتین، اسکولین، توئین ۸۰ راهیدرولیز کردند ولی آمیلاز تولید نکرده و در تحمل نمک طعام ۵٪ متغیر بودند. جدایه ها از مانیتول، سوکروز، اینولین، رافینوز، دی سوربیتول، ال آرابینوز، گلیسرول، دکسترین، اریتریتول، زایلوز، لاکتات، پیرووات، آسپارتات، مالونات، فومارات، سیترات و مالات استفاده ولی از ال‌رامنوز، دی ملزیتوز، ژرانیول، دی-ال متیونین، ال تارتارات، پروپیونات و بنزوآت استفاده نکردند و در استفاده از دی تارتارات و دی سالیسین متغیربودند. بر اساس نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی جدایه ها دارای شباهت زیادی بوده ولی تا حدودی با جدایه استاندارد ***Pv*** تفاوت داشتند. در آزمون بیماریزایی پس از ۳ تا ۷ روز لکه‌های نکروزه روی برگ‌های نارنج (Citrus aurantium) و لمون (C.limon) مشاهده گردید. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها از واکنش زنجیره ای پلیمراز BOX-PCR، ERIC-PCR و REP-PCR استفاده گردید. بر اساس درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده جدایه‌ها در سطح تشابه ۶۸ درصد در سه گروه ژنتیکی قرار گرفتند. این گروهبندی ژنومی نشان داد که جدایه‌های *P. viridiflava*، عامل بلاست مرکبات در درون خود نیز دارای تنوع قابل توجهی بوده و این تنوع با تمامی روش‌های rep-PCR به‌کارگرفته‌شده قابل انعکاس می‌باشد.

واژه های کلیدی:

Pseudomonas viridiflava. بلاست. درخت فیلوژنتیکی. پلیمراز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- خصوصیات جنس *Pseudomonas* Migula 1894 ..... ۶

۱-۲- طبقه بندی گونه های جنس *Pseudomonas* ۷

۱-۲-۱-گروه I هومولوژی rRNA ۷

۱-۲-۲-گروه II هومولوژی rRNA ۸

۱-۲-۳-گروه III هومولوژی rRNA ۹

۱-۲-۴-گروه IV هومولوژی rRNA ۱۰

۱-۲-۵-گروه V هومولوژی rRNA ۱۰

۱-۳- جایگاه تاکسونومیکی گونه *P. viridiflava* و خصوصیات آن ۱۰

۱-۴- مقایسه باکتری گونه *P. viridiflava* با سودو موناس های مشابه ۱۶

۱-۵- بیماریزایی *P. viridiflava* و علائم آن در مرکبات ۱۷

۱-۶- rep-PCR ۱۹

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- نمونه برداری ۲۳

۲-۲- جداسازی عامل بیماری ۲۳

۲-۳- نگهداری جدایه ها ۲۴

۲-۳-۱- نگهداری جدایه ها در آب مقطر استریل ۲۴

۲-۳-۲- نگهداری جدایه ها روی پتری ۲۴
۲-۴- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه ها..... ۲۴
۲-۵- الکتروفورز پروتئین..... ۲۵
۲-۵-۱- محلول پایه اکریل آمید ۳۰ درصد و متیلن بیس اکریل آمید ۸/. درصد..... ۲۵
۲-۵-۲- بافر نمونه ۲۵
۲-۵-۳- بافر ژل جدا کننده (۱/۵ M Tris- HCl + ۰/۴٪ SDS; pH:۸.۸)..... ۲۶
۲-۵-۴- بافر ژل متراکم کننده (۵/. M Tris- HCl + ۰/۴٪ SDS; pH:۶/۸)..... ۲۶
۲-۵-۵- بافر الکتروفورز (pH:۸/۳)..... ۲۶
۲-۵-۶- تهیه ژل اکریل آمید..... ۲۶
۲-۵-۷- ژل متمایز کننده ۱۰ درصد..... ۲۶
۲-۵-۸-ژل متراکم کننده ۵ درصد..... ۲۷
۲-۵-۹- آماده سازی نمونه پروتئین..... ۲۷
۲-۵-۱۰- الکتروفورز ۲۸
۲-۵-۱۱- رنگ آمیزی ژل ۲۸
۲-۵-۱۲- رنگبری ژل..... ۲۹
۲-۶- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)..... ۲۹
۲-۶-۱- استخراج DNAی ژنومی..... ۳۰
۲-۶-۲- سنجش مقدار DNAی استخراج شده..... ۳۰
۲-۶-۳ - بافر واکنش ۱۰x..... ۳۱
۲-۶-۴ - مخلوط واکنش جهت انجام آزمون PCR..... ۳۱

۲-۶-۵ - برنامه تکثیر برای آغازگر BOXA 1R ۳۳

۲-۶-۶ - برنامه تکثیر برای آغازگرهای ERIC 1R و ERIC 2 ..... ۳۳

۲-۶-۷ - برنامه تکثیر برای آغازگرهای REP1R و REP 2I ۳۴

۲-۶-۸-بافر TPBE (۱۰ x) ۳۴

۲-۶-۹ – الکتروفورز محصولات PCR ۳۵

۲-۶-۱۰ – آنالیز داده ها ۳۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نمونه برداری و جداسازی ۳۷

۳-۲- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه ها..... ۳۸

۳-۳- آزمون بیماری‌زایی..... ۴۱

۳-۴- الگوی پروتئین های سلولی جدایه ها..... ۴۱

۳-۵- اثر انگشت ژنتیکی DNAی ژنومی حاصل از BOX-PCR..... ۴۲

۳-۶- اثر انگشت ژنتیکی DNAی ژنومی حاصل از ERIC-PCR و آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 ..... ۴۵

۳-۷- اثر انگشت ژنتیکی DNAی ژنومی حاصل از REP-PCR ۴۷

۳-۸- آنالیز داده های حاصل از هر پنج پرایمر..... ۴۹

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

پیشنهادات..... ۵۸

منابع..... ۶۰

چکیده انگلیسی..... ۶۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱- علائم بیماری ۳۷

شکل ۳-۲- تولید مواد موکوئیدی ۳۸

شکل ۳-۳- مقایسه نقوش پروتئینی ۴۲

شکل۳-۴- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر DNAی ژنومی با روش ۴۳

شکل۳-۵- دندوگرام ارتباط ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Pseudomonas viridiflava* به دست آمده از باغات شرقی مازندران بر اساس نقوش حاصل از BOX-PCR ۴۴

شکل۳-۶- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر DNAی ژنومی با روش ERIC-PCR ۴۶

شکل۳-۷- دندوگرام ارتباط ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Pseudomonas viridiflava* به دست آمده از نواحی شرقی استان مازندران بر اساس نقوش ERIC-PCR ۴۶

شکل۳-۸- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر DNAی ژنومی با روش REP-PCR ۴۸

شکل۳-۹- دندوگرام ارتباط ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Pseudomonas viridiflava* به دست آمده از نواحی شرقی استان مازندران بر اساس نقوش REP-PCR ۴۸

شکل۳-۱۰- دندوگرام ارتباط میان ترکیب الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از BOXA 1R -PCR، ERIC 1R-PCR ، ERIC 2-PCR ۵۰

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- گروه بندی سودوموناس های فلورسنت بیماریزا در گیاهان..... ۱۲

جدول ۱-۲- خصوصیات گونه *P. viridiflava*..... ۱۳

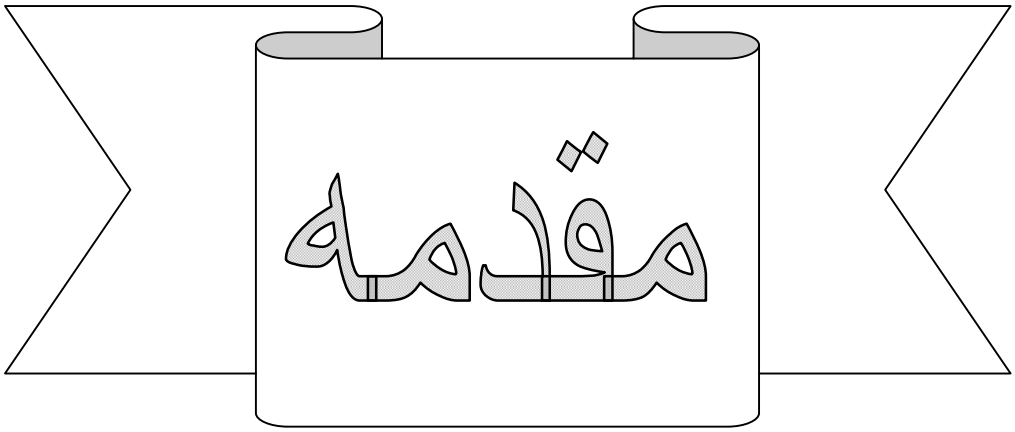
جدول ۱-۳- -خصوصیات گونه *P. viridiflava* تعیین شده توسط Sands و همکاران و Billing و همکاران ۱۵

جدول ۲-۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز همراه با توالی آنها..... ۲۹

جدول ۲-۲- مواد به‌کاررفته و مقدار هریک در مخلوط واکنش جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۳۲

جدول ۳-۱- مشخصات جدایه های *Pseudomonas viridiflava* ۳۹

جدول ۳-۲: خصوصیات فنوتیپی جدایه های *Pseudomonas viridiflava* ۴۰


مقدمه

گو نه های *Pseudomonas* فلورسانت اکسیداز منفی بیماریزا از قدیم به دو گروه *P.syringae* و*P.viriiflava* تقسیم شده اند (Palleroni ,N.J.1984). که بیش از ۴۰ پاتووار شناسایی شده را شامل می شود . واژه پاتووار به جدایه هایی اشاره دارد که بر اساس دامنه میزبانی و علائم و باکمک آزمون های بیوشیمیایی در سطح زیر گونه قرار داده شده اند (Hildepbrand *et al*., 1988,young *et al*., 1992). از این آزمون ها ، آزمون های تعیین کننده LOPAT (L:levan, O:oxidase , P:potato rot ,A: arginine dehydrolase , T: topbacco hypersensipbility) به طور گسترده جهت تمایز ایزوله ها به کار می رود. جدایه های *Pv* معمولاً به وسیله بیماریزایی و دو آزمون بیوشیمیایی ارائه شده در طرح LOPAT از *Ps* متمایز می شوند. جدایه های *Pv* ، ـامنفی (کلنی های مسطح در محیط دارای سوکروز زیاد تولید می کنند)و p مثبت (نمایانگر فعالیت پکتولیتیک قوی روی قطعات سیب زمینی) هستند (González *et al*., 2003). درحالیکه جدایه های *Ps* ،L مثبت (تولید کلنی هایی محدب با مواد موکوئیدی سفید رنگ) وP منفی هستند .جدایه های *Pv* غیر معمول جدا شده در این کار یک فعالیت متمایزی در آزمون ها نشان می هد ، یعنی در آزمون مواد موکوئیدی تولید می کند (رحیمیان ۱۳۷۶). همچنین در اغلب نقاط دنیا عامل بلاست مرکبات گونه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* است ولی در ایران *P.viriiflava* نیز به این عنوان شناخته شده است (رحیمیان۱۳۷۶). بعلاوه، جدایه های جدا شده از ایران از نظر خصوصیات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی و پلاسمیدی و خصوصیات سرولوژیکی نسبتاً یکنواخت بوده ولی از نظر نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی تا حدودی با ایزوله استاندارد*Pv* تفاوت دارند (گوهرزاده عطائی، رحیمیان ۱۳۷۹).

یکی از مهمترین دلایل عدم موفقیت در مدیریت بیماریهای گیاهی مربوط به ناقص بودن اطلاعات ما در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگرها می باشد و بالا بردن اطلاعات در این زمینه به طور حتم در اتخاذ روش های موثر کنترل و تنظیم استراتژی های کنترل، کارآمدتر خواهد بود(Mertin et al., 1997).

از طرف دیگر جمعیت های بیمارگر رو به تکامل است، چرا که باید با تغییراتی چون استفاده ازتناوب زراعی، کاربرد ارقام مقاوم، به کارگیری آفت کش ها و نوع آبیاری سازگاری حاصل کند. بنابراین اگر بخواهیم استراتژی کنترل مؤثر واقع شود، می بایست به جای تمرکز روی حالت انفرادی و ویژه، جمعیت ها را هدف قرار دهیم(McDonald, 1997).

شناسایی فنوتیپی باکتری به تنهایی اغلب ، جهت مشخص کردن روابط ژنتیکی داخل یا بین گونه ای با شکست مواجه می شود در دو دهه اخیر با گسترش استفاده از روش های مولکولی، تشخیص، نامگذاری و طبقه بندی پروکاریوت های بیماریزای گیاهی دچار تغییر شده است بر اساس توالی های کاملاً حفاظت شده، نیمه حفاظت شده و کاملاً متغیر ژن های باکتریایی، آغازگرهایی طراحی شده اند که در تشخیص کاربرد دارند(Hayward et al., 1996).

در حال حاضراطلاعات زیادی در مورد توالی ژن های 16S rRNA و 23S rRNA بدست آمده و نیز ابزارها و برنامه های کامپیوتری فراوانی برای پردازش این داده ها طراحی شده است. فیلوژنی مبتنی بر توالی ژن های 16S rRNA و 23S rRNA، چارچوب ثابتی برای شناسایی جنس ها و گونه ها و تجدید نظر در نامگذاری ایجاد نموده است (Hendson and French, 1992). بر خلاف توالی ژن های 16S rRNA که در میان گونه های باکتریایی تغییر پیدا می کند، ساختمان ژنوم طبیعت شفاف و واضحی در میان گروه های مختلف فیلوژنی باکتریایی دارد، بنابراین تشخیص طبقات فیلوژنی باکتری ها، می تواند بر اساس ساختمان کل ژنوم استقرار یابد(Liu et al., 1999).

عناصر تکراری DNA که به صورت طبیعی درون ژنوم گونه های متنوع باکتریایی پراکنده شده است، می تواند به عنوان جایگاهی برای تکثیرDNA ژنومی به کار رود. سه گروه از این توالی های تکراری که با بیشترین جزئیات مطالعه شده اند، توالی های REP (Repetitive Element Palindromic)، توالی ERIC (Enteropbacterial Repetitive Intergenic Consensus) و BOX هستند. با استفاده از آغازگرهای طراحی

شده بر اساس توالی های مذکور، پروتکل هایی تحت عنوان REP-PCR، ERIC-PCR و PBOX-PCR ارائه شده که منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنومی که بین این توالی ها واقع می گردند، شده است. الگوی ژنتیکی به دست آمده با این روش ها به عنوان یک بارکد برای هر استرین خاص باکتریایی عمل می نماید (Louws et al., 1994). مطالعات انجام شده نشان داده است که REP-PCR و ERIC-PCR روش های بسیار کارایی بوده و قادرند در سطح پاتووار یا سطوح تاکسونومیکی زیر آن، میان باکتری های بیمارگر تفاوت قائل شوند (Little et al. 1998).

بررسی حاضر به منظور تعیین موقعیت جدایه های شبه *P.viriiflava* عامل بلاست مرکبات شمال وقرابت آن ها با استرین مرجع با استفاده از روش های بیو شیمیایی و مولکولی (Rep-PCR، Eric-PCR و Box-PCR) پرداخته است. از نتایج به دست آمده می توان در تحقیقات اپیدمیولوژی مرتبط با این بیمارگر در میزبان های مختلف، بقاء اپی فیتی، رقابت و در نهایت استراتژی کنترل بیماری استفاده نمود.

بررسي منابع

۱-۱-خصوصیات جنس *Pseudomonas* Migula 1894

جنس *Pseudomonas* نخستین بار، به عنوان یک باکتری گرم منفی و میله ای شکل در سال ۱۸۹۴ توسط Migula توصیف شد (Pallerroni, 1984). سلول های این باکتری میله ای راست تا خمیده با عرض ۱/۵-۰/۵ و طول ۱/۵-۰/۵ میکرومتر می باشد. در بسیاری از گونه ها، پلی بتا هیدروکسی بوتیرات، به عنوان ماده کربنی ذخیره تجمع پیدامی کند. هیچ مرحله استراحتی در آنها شناسایی نشده است. گرم منفی بوده و بوسیله یک یا چند تاژک قطبی حرکت می کنند و تعداد بسیار کمی از آنها غیر متحرکند. در متابولیسم تنفسی آنها، اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون عمل می کند. اعضای این جنس قادر به تولید زانتومونادین نبوده و اغلب گونه ها نیاز به فاکتور رشد ندارند. اکسیداز آنها ممکن است مثبت یا منفی باشد. کاتالاز مثبت هستند. اغلب گونه ها قادر به رشد در شرایط اسیدی (PH:۴-۵) نمی باشند. اعضای این جنس به میزان زیادی در طبیعت پراکنده شده اند. برخی از گونه ها برای انسان، حیوانات یا گیاهان بیماریزا هستند. درصد G+C در DNAی ژنومی ۷۰-۵۸ درصد است. گونه تیپ این جنس *Pseudomonas aeruginosa* Migula 1900 (Schroeter, 1872) می باشد.

طبقه بندی جنس *Pseudomonas* در سال های اخیر، به دلیل تبدیل طبقه بندی کلاسیک و مبتنی بر خصوصیات فنوتیپی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; 1st ed., 1986) به طبقه بندی مبتنی بر خصوصیات ژنتیکی و فیلوژنی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; 2nd ed., 2001) دستخوش تغییرات زیادی شده است. این جنس در بر گیرنده گروه مهم و بزرگی از باکتری های گرم منفی می باشد (Todar, 2004).

۱-۲- طبقه بندی گونه های جنس *Pseudomonas*

کلیات طبقه بندی گونه های جنس *Pseudomonas*، از گروه بندی پیشنهاد شده توسط Pelleroni و همکاران در سال ۱۹۷۲ تبعیت می کند، که مبتنی بر مطالعات هیبریدیزاسیون DNA-rRNA می باشد. مطابق با این تقسیم بندی، جنس *Pseudomonas* بر اساس هومولوژی RNAی ریبوزومی به پنج گروه، طبقه بندی شده است. در این طبقه بندی جنس *Pseudomonas*، در بر دارنده ۴۰ گونه بوده و گونه های بیمارگر گیاهی فاقد طبقه بندی هایی مثل سروتیپ و بیووار بودند. درجه بالای هتروژنی در جنس مذکور، به دلیل حضور گونه هایی که فاصله فیلوژنی زیادی با هم دارند و امروزه به عنوان جنس های جدیدی معرفی می شوند، مشخص می گردد. در ابتدای سال ۱۹۹۰، اعضای گروه I در جنس *Pseudomonas* نگهداشته شده، ولی اعضای گروه های II، III، IV و V به جنس های جدید یا به جنس های قدیمی دیگری انتقال داده شدند (Palleroni *et al*., 1993). این طبقه بندی با اطلاعات فیلوژنی بدست آمده از توالی 16s r RNA مطابقت دارد (Widmer e al., 1998).

۱-۲-۱-گروه I هومولوژی rRNA

این گروه که بزرگترین گروه را در میان پنج گروه ذکر شده، تشکیل می دهد شامل گونه های فلورسنت (مانند *Pseudomonas flourescens* و *P. aeruginosa*) و بیمارگر های گیاهی (مانند *P. syringae* و *P.cichorii*) می باشد. چندین چندین گونه غیر فلورسنت و مهم دنیز در این گروه قرار می گیرند، که از جمله مهمترین آنها می توان به گونه *P. stutzeri* و *P. mendocina* اشاره نمود. گونه تیپ این گروه، *P. aeruginosa* می باشد.انتقال گونه ها به درون این گروه بزرگ ابتدا بر اساس آنالیز خصوصیات فنوتیپی و سپس با استفاده از هیبریدیزاسیون نوکلئیک اسیدها و آنالیزهای عددی توسعه پیدا کرد (Palleroni *et al*., 1972). هر چند کاربرد روش هیبریدیزاسیون rRNA-DNA، تفکیک قطعی این گروه را از دیگر گونه

های جنس *Pseudomonas* به میزان زیادی حمایت می کند (Palleroni *et al.*, 1973). بسیاری از گونه های قرار گرفته در این گروه، گونه های هتروژنی را تشکیل می دهند که به زیر گونه هایی تحت عنوان بیوتیپ یا بیووار قابل طبقه بندی می باشند، حتی برخی از این بیووارها ممکن است مجوز ایجاد یک گونه جدید را بگیرند.

سودوموناس های فلورسنت و بیماریزای گیاهی نیز، مشکلات تاکسونومیکی خاص خود را دارند. این گروه از طریق منفی بودن واکنش آرژنین دی هیدرولیز، مثبت بودن واکنش بیماریزایی روی برگ های توتون و پائین بودن سرعت رشد، از سودوموناس های فلورسنت ساپروفیت قابل تشخیص می باشند (Sands *et al.*, 1970). از جمله بیمارگر های گیاهی می توان به *P. syringae* و *P. cichorii* اشاره نمود. گونه *P. syringae* از استرین های زیادی که تحت عنوان پاتووار از هم متمایز می شوند، تشکیل شده است. این استرین ها بر اساس تفاوت در دامنه میزبانی و نوع علائمی که در گیاه میزبان ایجاد می کند از هم تفکیک می شوند (Young *et al.*, 1978).

گونه های زیر در گروه rRNAI قرار می گیرند:

P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. chlororaphis, P. syringae, P. cichorii, P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. agarici, P. angulata, P. fragi, P. synxantha, P. taetrolens, P. mucilodens, P. olevorans و *P. resinovoran*.

۱-۲-۱-گروه II همولوژی rRNA

اغلب گونه های موجود در این گروه بیمارگر بوده و قادر به دی نیتریفیکاسیون نمی باشند. یکی از مهم ترین این گونه ها، *Burkholderia(Pseudomonas) cepacia* می باشد، که هم بیمارگر گیاهی و هم بیمارگر جانوری است. این گونه از نظر خصوصیات تغذیه ای، متنوع ترین عضو این جنس می باشد. دو

گونه دیگر این گروه ، *B. (Pseudomonas) mallei* و *B. (Pseudomonas) pseudomallei* می باشند که هر دو عامل بیماری های جانوری بوده و بسیار هتروژن می باشند (Todar, 2004).

این گروه شامل گونه های زیر می باشد:

P. sepacia, P. gladioli, P. mallei, P. picketti, P. pseudomallei, P. pyrrocinia, P. andropogonis, P. caryophilli و *P. solonacearum*.

گونه *P. solonacearum* در ویرایش هشتم کتاب برگیز در گروه همولوژی III قرار گرفت و هم اکنون به جنس *Ralstonia* تغییر مکان پیدا کرده است (Todar, 2004).

۱-۲-۳-گروه III همولوژی rRNA

این گروه شامل پنج گونه است. دو گونه *Comamonas (Pseudomonas) acidovorans* و *Comamonas (Pseudomonas) testeroni* ، فاصله بسیار زیادی با دیگر گونه های ودوموناس داشته و در جنس جدید *Comamonas* قرار گرفته اند (Todar, 2004).

این گروه شامل گونه های زیر می باشد:

P. saccharophila، *Comamonas (Pseudomonas) testeroni*، *Comamonas (Pseudomonas) acidovorans*، *P. facilis*، *P. delafieldii*، *P. alboprecipitans* و *P. palleronii*.

۱-۲-۴-گروه IV همولوژی rRNA

دو گونه *P. vesicularis* و *P. diminuta* در این گروه قرار می گیرند. این دو گونه از نظر خصوصیات، شبیه به استرین های جنس *Gluconobacter* می باشند (Palleroni *et al.*, 1972).

۱-۲-۵-گروه V همولوژی rRNA

این گروه شامل گونه های *Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia* و گونه های جنس *Xanthomonas* می باشد (Todar, 2004).

۱-۳- جایگاه تاکسونومیکی گونه *P. viridiflava* و خصوصیات آن

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma proteopbacteria

Order: Pseudomonadales

family: Pseudomonadaceae

genus: *Pseudomonas*

Species: *Pseudomonas viridiflava*

گونه *P. viridiflava* ابتدا در سال ۱۹۲۷ از گیاه لوبیا (*Phaseolus sp.*) در کشور سوئیس جداسازی شد (Gardan *et al*., 1999). این گونه در گروه سودوموناس های فلورسنت قرار داشته و خصوصیات نزدیکی با گونه *P. syringae* دارد. باکتری های این گونه میله ای شکل، گرم منفی و دارای یک یا دو تاژک قطبی هستند. جدایه های این گونه در محیط King-B رنگ فلورسنت تولید کرده، اکسیداز منفی و فاقد آنزیم های آرژنین دی هیدرولاز و آمیلاز می باشند. در دمای ۴۱ درجه سانتی گراد رشد نکرده و نیترات را احیا نمی کنند. باکتری های این گونه سیب زمینی را له کرده، ژلاتین و اسکولین را هیدرولیز می کنند. تفاوت این گونه با گونه های سودوموناس فلورسانت بیماریزا بر اساس سیستم Lelliott و همکاران (۱۹۶۶) به شرح ذیل می باشد: