بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی
گروه گیاهپزشکی
گرایش بیماری‌شناسی گیاهی

مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در استان گیلان با استفاده از نشانگرهای AFLP

از
سمیرا رئیسی دهکردی

استاد راهنما
دکتر سید علی الهی‌نیا

استادان مشاور
دکترحبیبا... سمیع‌زاده
مهندس علی‌اکبر عبادی

اسفند ۸۹

تقدیم به پروردگارم ؛

تقدیم به پدر ، صلابت و استواری . . .

او که امروز من ، آرزوی دیروزش بود ؛

پیشکش مادر ، صبر و آرامش

کسی که طنین مادرانه دعاهایش فردا را برایم آسان می کند ؛

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی ، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است ، به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

"ن و القلم و ما یسطرون"

منزهی تو، چه تنگ است راه‌ها بر کسی که تو راهنمایش نباشی و چه آشکار است حق نزد کسی که راه را نشانش دادی.

امروز که به توفیق مهربان ایزد، راهی دیگر از زندگی را با موفقیت سپری کردم پیشانی شکر بر سجده‌گاه عبودیت می‌سایم و بر خود واجب می‌دانم از هم رهانم در این راه قدر-دانی نمایم و با شهادت قلم چند سطری به پاس زحمات بی‌دریغشان بنگارم.

بوسه بر دستان مردانه پدر و چشمان دعاگوی مادر می‌زنم و از خداوند می‌خواهم که در میان دست نوشته‌های محتوم و مکتوم سرنوشت عمری بیافزاید تا گوشه‌ای از الطافشان را به جای آورم.

سپاس بی‌دریغ نثار راهنمای مراحل علم و ادب جناب پروفسور سیّد علی الهی نیاکه با ارشادهای عالمانه‌شان غفلت و کسلت را از وجودم زدودند و با نگاه غامض خطی بر کاستی‌های من کشیدند.

از زحمات استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور که همواره حامی من در این راه بود سپاس گزارم.

از اشارت‌های استادانه مهندس علی اکبر عبادی و دکتر حبیب الله سمیع زاده که لحظه‌ای نگاه مهربانشان را از من دریغ نکردند کمال امتنان را دارم.

از استادان ارجمندم جناب آقای دکتر جمالی و دکتر روحی بخش که افتخار قضاوت و بازخوانی این پژوهش را بر عهده گرفتند و اطناب صفحات و کاستی‌های اولین تجربه شاگرد خطاکار، ذهن مجربشان را نیازرد سپاس گزارم.

از استادان محترم گروه گیاه پزشکی و مدیر گروه محترم دکتر حاجی زاده که در محضرشان علم، اخلاق و زندگی آموختم و آنچه آموختند و نیاموختم، منت پذیرم.

از مسئول محترم آزمایشگاه بیماری شناسی جناب آقای مهندس سلیمی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همراهی و دلگرمی‌های دوست عزیزم سرکار خانم مهندس سمیّه داریوش که در مرحله به مرحله این پایان نامه حضور داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم و از خداوند منان آرزومند بهترین‌ها برایشان می‌باشم.

از دوست عزیز و مهربانم سرکار خانم مهندس مریم مهدوی مقدم سپاس گزارم.

از همکاری‌های بی‌دریغ آقایان خشنود و خاتمی سپاس گزارم.

اسفندماه ۱۳۸۹

سمیرا رئیسی دهکردی

چکیده

عنوان : مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار در استان گیلان با استفاده از نشانگرهای AFLP

سمیرا رئیسی دهکردی

تنوع ژنتیکی ۳۱ جدایه باکتری *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار که طی سال‌های ۱۳۸۳-۱۳۸۲ از استان گیلان نمونه برداری و شناسایی شده بودند، با استفاده از نشانگرهای AFLP تغییر یافته مورد ارزیابی قرار گرفتند. این کار به منظور بررسی ساختاری جمعیت این باکتری، تنوع ژنتیکی آن و مقایسه پروفایل ژنتیکی این باکتری با سایر باکتری‌ها صورت گرفت. یک جدایه از باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده از گندم و ۲ جدایه *X. axonopodis* pv. *citri* و *X. arboricola* pv. *juglandis* به عنوان جدایه‌های خارج از گروه (outgroup) درنظرگرفته شدند. استخراج DNA به روش ون ایس و همکاران(۱۹۸۹) صورت گرفت. تهیه و هضم آداپتور، هضم DNA واتصال آن به آداپتور هضم‌شده صورت گرفت. دوازده آغازگر اختصاصی برای تکثیر DNA به کارگرفته شد. جدا سازی قطعات حاصل از تکثیر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد صورت گرفت. دوازده آغازگر به کار گرفته شده، درمجموع ۲۸۵ نوار چند شکل ایجاد کردند. آغازگر ۳۵ و۳۶ با ۳۰ باند و آغازگر ۴ و ۱۸ با ۱۹ باند بیشترین و کمترین قطعات تکثیری را به خود اختصاص دادند. آغازگر۱۲ و ۱۸ به ترتیب با ۰/۳۰ و ۰/۱۵ بیشترین و کمترین مقدار تنوع ژنی نی (H)، آغازگر۱۲ و ۱۸ به ترتیب با ۰/۳۰ و ۰/۱۵ بیشترین و کمترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و آغازگر ۱۲ و ۱۸ به ترتیب با ۰/۴۷ و ۰/۲۷ بیشترین و کمترین میزان شاخص شانون را به خود اختصاص دادند. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تطابق ساده ترسیم و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام‌شد. نتایج نشان داد که با سطح تشابه ۷۷ درصد جدایه‌ها در ۶ گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه *P. s.* pv. *syringae* و *X. ax.* pv. *citri* هر کدام به طور جداگانه درگروه‌های مجزا و تمام جدایه‌های *X. arboricola* در ۴ گروه دیگر قرار گرفتند. نشانگرهای AFLP تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این باکتری را نشان دادند. ارتباطی بین گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از الگوهای باندیAFLP و گونه گیاه میزبان و منطقه جغرافیایی وجود نداشت. اما نشانگرAFLP جدایه‌های باکتری سایرگونه‌های جدا شده از میزبان‌های غیر هسته‌دار را به خوبی از جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* - جدا شده از درختان میوه هسته‌دار- متمایز کرد. تنوع بین جمعیتی از تنوع درون جمعیتی بیشتر است. بیشترین فاصله ژنتیکی بر اساس شاخص Nei بدون احتساب اریبی و با احتساب اریبی بین جمعیت گوجه سبز و گروه خارجی وجود دارد و بیشترین تشابه ژنتیکی بر اساس شاخص Nei بدون احتساب اریبی و با احتساب اریبی بین جمعیت‌های آلو و گیلاس دیده می‌شود. بالا بودن میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های باکتری جدا شده از گونه‌های مختلف هسته‌داران را می‌توان به یکسان بودن منطقه جغرافیایی و اقلیمی جدایه‌ها و نیز تشابه بسیار زیاد گونه گیاهان میزبان (درختان میوه هسته‌دار) نسبت داد.

کلید واژه‌ها : نشانگر AFLP، تنوع ژنتیکی، *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*، لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی: ..... ذ
چکیده انگلیسی: ..... ر
مقدمه: ۲
فصل اول:کلیات و مرور منابع: ۵
۱- ۱- مشخصات گیاه شناسی درختان میوه هسته‌دار ۶
۱- ۲- سطح زیر کشت و عملکرد درختان هسته‌دار در ایران وجهان ۶
۱- ۳- بیماری‌های مهم درختان هسته‌دار. ۶
۱- ۴- بیماری‌های باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ۷
۱- ۵- بررسی تاکسنومی جنس *Xanthomonas* ۸
۱- ۶- خصوصیات باکتری شناسی جنس *Xanthomonas* Dowson, 1939 ..... ۸
۱- ۷- خصوصیات باکتری شناسی *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin *et al.* ۹
۱- ۸- موقعیت تاکسونومیک *X. arboricola* pv. *pruni* ۱۰
۱- ۹- خصوصیات ژنومی *X. arboricola* pv. *pruni* ۱۰
۱- ۱۰- خصوصیات فنوتیپی *X. arboricola* pv. *pruni* ۱۰
۱- ۱۱- بیماری لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار... ..... ۱۱
۱- ۱۱- ۱- میزبان‌های این باکتری ۱۲
۱- ۱۱- ۲- توزیع جغرافیایی باکتری ۱۲
۱- ۱۱- ۳- علائم بیماری لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ۱۳
۱- ۱۱- ۴- تغییرات سلولی بافتی میزبان در اثر حمله پاتوژن. ۱۴
۱- ۱۱- ۵- چرخه بیماری ۱۶
۱- ۱۱- ۶- شرایط توسعه بیماری ۱۶
۱- ۱۱- ۷- عوامل انتشار باکتری ۱۷
۱- ۱۱- ۸- اهمیت اقتصادی این باکتری. ۱۷
۱- ۱۱- ۹- بررسی‌های قرنطینه ای. ۱۷
۱- ۱۱- ۱۰- روش‌های کنترل بیماری ۱۷
۱- ۱۲- باکتری‌های مرجع ۱۸
۱- ۱۳- ژنتیک باکتری‌ها ۱۸
۱- ۱۴- تنوع ۱۸
۱- ۱۴- ۱- اندازه‌گیری تنوع در *X. arboricola* pv. *pruni* ۱۹
۱- ۱۴- ۱- ۱- روش‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های بیماریزایی ۲۰
۱- ۱۴- ۱- ۲ - تنوع مولکولی در *X. arboricola* pv. *pruni* ۲۰
۱- ۱۵- بررسی تنوع ژنتیکی در باکتری‌ها ۲۰
۱- ۱۶- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA ۲۱
۱- ۱۷- انواع نشانگرهای DNA ۲۲
۱- ۱۷- ۱- نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR ۲۲

۱- ۱۷- ۱- ۱- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (RFLP) ۲۲
۱- ۱۷- ۲ - نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۲۳
۱- ۱۷- ۲-۱- تکثیر تصادفی DNA چند شکل(RAPD) ۲۴
۱- ۱۷- ۲- ۲- PCR عناصر تکرار شونده (REP-PCR) ۲۴
۱- ۱۷- ۲- ۳- ریز ماهواره‌ها یا میکروستلایت‌ها یا SSR ۲۵
۱- ۱۸- AFLP ۲۶
۱- ۱۸- ۱- اصول روش AFLP ۲۶
۱- ۱۸- ۱- ۱- هضم DNA ژنومی ۲۷
۱- ۱۸- ۱- ۲ - آداپتورها و اتصال آنها به انتهای قطعه‌های برشی ۲۸
۱- ۱۸- ۱- ۳ - آغازگرهای AFLP ۲۸
۱- ۱۸- ۱- ۴ - تکثیر قطعات بریده شده ۲۸
۱- ۱۸- ۱- ۵ - الکتروفورز فراورده‌های PCR ۲۹
۱- ۱۸- ۲ - مزایای نشانگر AFLP ۳۰
۱- ۱۸- ۳ - معایب نشانگر AFLP ۳۱
۱- ۱۸- ۴ - کاربرد نشانگر AFLP ۳۱
۱- ۱۸- ۵ - کاربرد نشانگر AFLP در باکتری شناسی ۳۲
۱- ۱۸- ۶ - انواع نشانگرهای AFLP ۳۳
۱- ۱۹- آنالیزهای مولکولی روی *X. arboricola* pv. *pruni* ۳۳
۱- ۲۰- منشا باکتری *Xap* ۳۷
۱- ۲۱ - کاربرد نشانگر simplified- AFLP در باکتری‌ها ۳۷
۱- ۲۲ - کاربرد نشانگر AFLP در سایر باکتری‌ها ۳۹
فصل دوم:مواد و روش‌ها: ۴۵
۲- ۱- جدایه‌های باکتری ۴۶
۲- ۲ - کشت و نگهداری جدایه‌ها ۴۶
۲- ۳ - کشت باکتری به منظور استخراج DNA ۴۸
۲- ۴ - استخراج DNA ژنومی، نگهداری و آماده سازی جهت استفاده در PCR ۴۸
۲-۴-۱- برای استخراج DNA از روش ون ایس و همکاران (۱۹۸۹)استفاده شد این روش دارای مراحل زیر است ۴۸
۲- ۴- ۲- تخمین غلظت DNA استخراج شده ۴۹
۲- ۵ - انجام واکنش simplified AFLP ۴۹
۲- ۵-۱- تهیه و هضم آداپتور ۴۹
۲- ۵-۱-۱- واکنش تهیه و هضم آداپتور ۵۰
۲- ۵-۱-۲ - مشخصات آنزیم TaqI ۵۱
۲- ۵-۲ - هضم DNA و اتصال (لیگاز شدن) به آداپتور هضم شده : ۵۱
۲- ۵-۲-۱- واکنش هضم و لیگاز شدن (Digestion and Ligation) ۵۱
۲- ۵-۲-۲ - خصوصیات آنزیم MspI ۵۲
۲- ۵-۲-۳ - خصوصیات آنزیم T4 DNA Ligase ۵۲
۲- ۶ - واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۳

۲- ۶- ۱ - مواد مورد نیاز برای انجام واکنش در حجم نهایی ۲۵ µl به شرح زیرتهیه شد ۵۳
۲- ۶-۱- ۱- بافر PCR ۵۳
۲- ۶- ۱-۲ - کلرید منیزیم (MgCl2) ۵۳
۲- ۶- ۱-۳ - مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات (dNTPs) ۵۴
۲- ۶-۱- ۴ - آنزیم Taq DNA polymerase ۵۴
۲- ۶-۱- ۵- DNA الگو ۵۵
۲- ۶-۱- ۶ - آغازگرها ۵۵
۲- ۶-۱- ۷ - آب دو بار تقطیر ۵۷
۲- ۷ - مقادیر و غلظت‌های نهایی ۵۷
۲- ۸ - بررسی وجود آلودگی در واکنش PCR ۵۸
۲- ۹ - برنامه حرارتی و انجام PCR ۵۹
۲- ۱۰ - الکتروفورز ۶۰
۲- ۱۰- ۱- بافرها و محلول‌های مورد نیاز ۶۰
۲- ۱۰- ۱- ۱- بافر بارگیری ۶۰
۲- ۱۰- ۱- ۲ - بافر TBE ۶۰
۲- ۱۰- ۱- ۳ - محلول اتیدیوم بروماید ۶۰
۲- ۱۰- ۱- ۴ - نشانگر اندازه ۶۰
۲- ۱۰- ۱- ۵ - ژل آگاروز ۶۱
۲- ۱۱ - انجام الکتروفورز ۶۱
۲- ۱۲ - رنگ آمیزی ژل و مشاهده باندها ۶۲
۲- ۱۳ - تعیین وزن مولکولی باندها ۶۳
۲- ۱۴ - امتیازدهی به باندها ۶۳
۲- ۱۵ - تفکیک جدایه‌های مورد مطالعه ۶۳
۲- ۱۶ - تجزیه و تحلیل آماری ۶۳
۲- ۱۶- ۱ - بررسی سودمندی نشانگرهای AFLP ۶۴
۲- ۱۶- ۱-۱- محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۶۴
۲- ۱۶- ۱-۲ - میزان هتروزیگوسیتی (H) ۶۵
۲- ۱۷ - محاسبه شاخص‌های دیگر آغازگر ۶۵
۲- ۱۸ - محاسبه درصد جایگاه‌های چندشکل در هر آغازگر ۶۵
۲- ۱۹ - محاسبه فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده آغازگرها ۶۶
۲- ۲۰ - محاسبه تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۶۶
۲- ۲۱ - محاسبات ژنتیک جمعیت ۶۶
۲- ۲۱- ۱ - تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۶۷
۲- ۲۱- ۱- ۱ - محاسبه تنوع ژنی ۶۷
۲- ۲۱- ۱- ۲ - محاسبه چندشکلی یا پلی مورفیسم ۶۷
۲- ۲۱- ۱- ۳ - محاسبه تنوع ژنوتیپی ۶۷
۲- ۲۱- ۲ - تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۶۸
۲- ۲۱- ۲- ۱ - آماره F رایت ۶۸

۲- ۲۱- ۲- ۲ - آماره G نی ۶۹
۲- ۲۲ - تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۶۹
۲- ۲۳ - دسته بندی و کاهش داده‌ها ۷۰
۲- ۲۳- ۱- تجزیه خوشه‌ای ۷۰
۲- ۲۳- ۱- ۱ - مراحل انجام تجزیه خوشه‌ای ۷۱
۲- ۲۳- ۱- ۲ - تأ ییدتجزیه کلاستر (محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک) ۷۱
۲- ۲۳- ۲ - تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) ۷۲
فصل سوم: نتایج و بحث : ۷۴
۳- ۱ - نتایج حاصل از استخراج DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* ۷۵
۳- ۲ - تکثیر اختصاصی قطعات در واکنش تکثیرPCR ۷۶
۳- ۳ - تعداد نوارهای تولید شده توسط آغازگرها ۷۶
۳- ۴ - الگوهای باندی درجمعیت‌ها ۸۱
۳- ۵ - الگوهای باندی درجمعیت‌ها ی باکتری جدا شده از درختان هسته‌دار ۸۲
۳- ۶ - تصاویر ژل‌ها و الگوی نواربندی آغازگرها ۸۳
۳- ۷ - نتایج بررسی فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده توسط آغازگرهایAFLP ۹۵
۳- ۸ - تعیین سودمندی نشانگرهایAFLP ۹۷
۳- ۸- ۱ - ظرفیت اطلاعات چند شکلی(PIC) ۹۷
۳- ۸- ۲ - هتروزیگوسیتی(H) ۹۷
۳- ۸- ۳ - تعداد الل موثر(Ne) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) ۹۸
۳- ۹ - تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۹۹
۳- ۹- ۱- تعداد الل مشاهده شده(Na)، تعداد الل مؤثر (Ne) و تنوع ژنی نی ۹۹
۳- ۹- ۲ - درصد جایگاه‌های چندشکل (P) در جمعیتها ۱۰۰
۳- ۹- ۳ - شاخص اطلاعاتی شانون (I) ۱۰۰
۳- ۹- ۴ - محاسبه تمایز ژنی (Gst) و مقدار جریان ژن (Nm) ۱۰۱
۳- ۱۰- فاصله ژنتیکی جدایه های باکتریایی با یکدیگر(GD) ۱۰۱
۳- ۱۱ - تجزیه به مختصات اصلی (PCA) ۱۰۲
۳- ۱۲ - توزیع هر یک از جدایه‌های باکتری جدا شده از درختان هسته‌دار ۱۰۳
۳- ۱۳ - آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) ۱۰۵
۳- ۱۴ - آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)در بین جمعیت‌های درختان هسته‌دار ۱۰۶
۳- ۱۵ - نتایج محاسبه فاصله و تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۰۸
۳- ۱۶ - گروهبندی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای ۱۰۹
۳- ۱۶- ۱ - تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها ۱۰۹
۳- ۱۶- ۲ - تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها ۱۱۱
۳- ۱۷ - محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک ۱۱۵
۳- ۱۸- گروه بندی جدایه‌ها با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) ۱۱۷
۳- ۱۹ - نتیجه گیری ۱۲۰
۳-۲۰ - پیشنهادات ۱۲۱
منابع ۱۲۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱- ۱ - خصوصیات فنوتیپی *X. arboricola* pv. *pruni* ۱۱
جدول۲- ۱ - جدایه‌های باکتری مورد استفاده در این تحقیق ۴۷
جدول۲- ۲ - مشخصات یک رشته آداپتور یا سازگارساز ۵۰
جدول۲- ۳ - مشخصات آغازگرها ۵۶
جدول۲- ۴ - نام و توالی آغازگرهای AFLP مورد استفاده در این تحقیق ۵۷
جدول۲- ۵ - مواد و مقدار مورد استفاده در واکنش PCR به همراه غلظت محلول پایه و غلظت نهایی آنها در واکنش در حجم ۲۵میکرولیتر ۵۸
جدول۲- ۶ - برنامه حرارتی برای انجام واکنش AFLP ۵۹
جدول۲- ۷ - روش آماده سازی مواد و محلول‌های مورد استفاده در الکتروفورز DNA ۶۱
جدول۲- ۸ - جمعیت‌ها و جدایه های مربوط به آنها ۶۳
جدول۲- ۹ - تجزیه واریانس مولکولی ۷۰
جدول۳- ۱ - مقایسه آغازگرها از نظر تولید نوار ۷۸
جدول۳- ۲ - دامنه نوارهای تولید شده در جدایه های *Xap*در هر یک از آغازگرها ۷۹
جدول۳- ۳ - فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده در آغازگرها ۹۶
جدول۳- ۴ - مقادیرNe ، I ، PIC ، H محاسبه شده برای آغازگرها ۹۸
جدول۳- ۵ - متوسط تعداد الل مشاهده شده، الل مؤثر وتنوع ژنی Nei برای جمعیت‌ها ۹۹
جدول۳- ۶ - تنوع ژنوتیپی و درصد جایگاه‌های چندشکل به تفکیک جمعیت‌ها ۱۰۰
جدول۳- ۷ - درصد واریانس و واریانس تجمعی که به وسیله سه محور اول توضیح داده می شود. ۱۰۳
جدول۳- ۸ - درصد واریانس و واریانس تجمعی که به وسیله سه محور اول توضیح داده می شود (چهار جمعیت) ۱۰۴
جدول۳- ۹ - داده‌های حاصل از آنالیز تجزیه مولکولی ۱۰۵
جدول۳- ۱۰ - داده‌های حاصل از آنالیز تجزیه مولکولی(چهار جمعیت) ۱۰۶
جدول۳- ۱۱ - تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس شاخص Nei با احتساب اریبی ۱۰۸
جدول۳- ۱۲ - تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس شاخصNei بدون احتساب اریبی ۱۰۸
جدول۳- ۱۳- مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی هر مؤلفه، حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۱۹

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱- ۱ - نقشه توزیع جغرافیایی پاتوژن[OEPP/EPPO,2006]. ۱۳
شکل۱- ۲ - علایم لکه باکتریایی روی میوه هلو ۱۵
شکل۱- ۳ - علایم شانکر باکتریایی روی شاخه آلو ۱۵
شکل۱- ۴ - علایم شانکر باکتریایی روی تنه آلوی ژاپنی ۱۵
شکل۱- ۵ - علایم لکه باکتریایی روی برگ آلو ۱۵
شکل۱- ۶ - علایم لکه باکتریایی روی میوه آلوی ژاپنی ۱۵
شکل۱- ۷ - علایم لکه باکتریایی روی میوه آلو ۱۵
شکل۱- ۸ - نمایی از نحوه تکثیر انتخابی قطعات هضم شده DNA [بیلیرز و همکاران، ۱۹۹۸] ۳۰
شکل۲- ۱ - جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی ۴۷
شکل۲- ۲ - نحوه هضم آداپتور ۵۰
شکل۲- ۳ - انجام واکنش PCR ۵۴
شکل۲- ۴ - بررسی وجود آلودگی در واکنش ۵۸
شکل۲- ۵ - انجام واکنشPCR ۵۹
شکل۲- ۶ - دستگاه ژل داک جهت عکس برداری از ژل‌ها ۶۲
شکل۲- ۷ - دستگاه الکتروفورز ۶۲
شکل۳- ۱ - نحوه تکثیر اختصاصی قطعات هضم شده. ۷۶
شکل۳-۲ - الگوهای باندی در هر جمعیت ۸۱
شکل۳- ۳ - الگوهای باندی در هریک از جمعیت های باکتریایی جدا شده از درختان هسته‌دار ۸۲
شکل۳- ۴ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۳ ..... ۸۳
شکل۳- ۵ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۳ ..... ۸۴
شکل۳- ۶ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۴ ..... ۸۴
شکل۳- ۷ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۴ ..... ۸۵
شکل۳- ۸ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۷ ..... ۸۵
شکل۳- ۹ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۸ ..... ۸۶
شکل۳- ۱۰- الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۸ ..... ۸۶
شکل۳- ۱۱- الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۰ ..... ۸۷
شکل۳- ۱۲ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۰ ..... ۸۷
شکل۳- ۱۳ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۲ ..... ۸۸
شکل۳- ۱۴ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۲ ..... ۸۸
شکل۳- ۱۵ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۵ ..... ۸۹
شکل۳- ۱۶ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۵ ..... ۸۹
شکل۳- ۱۷ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگرP۱۸ ..... ۹۰

شکل۳- ۱۸ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۱۸ ..... ۹۰
شکل۳- ۱۹ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۵ ..... ۹۱
شکل۳- ۲۰ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۵ ..... ۹۱
شکل۳- ۲۱ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۶ ..... ۹۲
شکل۳- ۲۲ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۶ ..... ۹۲
شکل۳- ۲۳ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۸ ..... ۹۳
شکل۳- ۲۴ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۳۸ ..... ۹۳
شکل۳- ۲۵ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۴۲ ..... ۹۴
شکل۳- ۲۶ - الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* توسط آغازگر P۴۲ ..... ۹۴
شکل۳- ۲۷ - متوسط فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده توسط هر آغازگر ۹۵
شکل۳- ۲۸ - پراکنش هر یک از افراد جامعه ۱۰۲
شکل۳- ۲۹ - پراکنش هر یک از افراد جمعیت‌های جدا شده از درختان هسته دار ۱۰۴
شکل۳- ۳۰ - نمودار حاصل از تجزیه واریانس مولکولی ۱۰۵
شکل۳- ۳۱ - نمودار حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در جمعیت‌های باکتریایی جدا شده از درختان هسته‌دار ۱۰۶
شکل۳- ۳۲ - دندروگرام رسم شده با استفاده از روش UPGMA بر اساس فواصل و تشابه ژنتیکی محاسبه شده بین جمعیت ها.... ۱۰۹
شکل۳- ۳۳ - دندروگرام به دست آمده برای جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* با استفاده از ضریب تشابه SM و روش UPGMA بر اساس داده‌های AFLP روی DNA ژنومی. ۱۱۶
شکل۳- ۳۴ - پراکنش دو بعدی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *pruni* بر اساس دو مؤلفه اصلی اول. ۱۱۸
شکل۳- ۳۵ - پراکنش سه بعدی جدایه‌های *X. arboricola*pv. *pruni* بر اساس سه مؤلفه اصلی اول ۱۱۸

مقدمه

Xanthomonas arboricola Vauterin. یک گونه باکتری بیماری‌زای گیاهی است. در بازنگری که در تاکسنومی جنس *Xanthomonas* (اغلب شامل باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی) توسط واترین و همکاران انجام شد، گونه‌های جدیدی در این جنس تعریف شد و بسیاری از پاتوارهای *Xanathomonas campestris* به سطح گونه ارتقا یافتند. *Xanthomonas arboricola* یک پاتوژن گیاهی با دامنه میزبانی محدود بوده است که از نظر ژنتیکی با سایر گونه‌های *Xanthomonas* متفاوت می باشد و شامل پاتوارهایی مانند *X. arboricola* pv. *pruni* ، *X. arboricola* pv. *juglandis* ، *X. arboricola* pv. *corylina* ، *X. arboricola* pv. *celebenis* ، *X. arboricola* pv. *populi* ، *X. arboricola* pv. *poinsetticola* می باشد. نام *X. arboricola* pv.*pruni* به عنوان بخشی از این بازنگری پیشنهاد شده‌است [واترین و همکاران[1]، ۱۹۹۵]. اخیرا یک پاتوار جدیدی از این باکتری به نام *X. arboricola* pv. *fragariae* معرفی شده‌است [جانس و همکاران[2]، ۲۰۰۱].

بیماری‌زایی محدود از ویژگی‌های بارز پاتوارهای جنس *Xanthomonas* می باشد [هایوارد و همکاران[3]، ۱۹۹۳]. اساس ژنتیکی این امر می‌تواند به عناصر متحرک ژنتیکی در باکتری‌ها نسبت داده شود [مونتریو و همکاران[4]، ۲۰۰۵] . جنس *Xanthomonas* تنوع بیماریی زایی بالایی را برخلاف همسانی فنوتیپی نشان می‌دهد که مانع از طبقه بندی ثابتی از این جنس در طول زمان شده است . در دهه‌های گذشته تعداد زیادی از استرین‌ها به وسیله روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین خصوصیت شدند و مطالعات گسترده هیبریداسیون DNA، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز براساس توالی‌های تکرار پذیر و چند شکلی در طول قطعات حاصل از تکثیر که نوعی انگشت نگاری ژنومی بودند به طور واضح تنوع ژنتیکی و روابط گونه‌های درون این جنس را آشکار کرد [واترین و همکاران ، ۲۰۰۰].

باکتری *X.arboricola* pv. *pruni* عامل لکه باکتریایی درختان میوه هسته‌دار (BSSF) برای اولین‌بار در سال ۱۹۰۳ توسط اسمیت[5] از میشیگان[6] ایالات متحده آمریکا روی آلوی ژاپنی گزارش شد [اسمیت ،۱۹۰۳] . اما امروزه این پاتوژن در تمام قاره‌ها وجود دارد ، این باکتری برای اولین بار از اروپا از ایتالیا در سال ۱۹۲۰ گزارش شد ودر سال‌های دهه ۱۹۷۰در اروپا به

1 - Vauterin et al.
2 - Janse et al.
3 - Hayward et al.
4 - Monterio -Vitorello et al.
5 - Smith
6 - Michigan

صورت بومی درآمد [باتیلانی و همکاران [۱]، ۱۹۹۹]. این باکتری برای اولین بار از ایران توسط جامی و همکاران در سال ۲۰۰۵ از استان گیلان گزارش شد [جامی و همکاران [۲]، ۲۰۰۵]. شناسایی این پاتوژن به کمک مورفولوژی کلنی، تست‌های بیوشیمیایی ویژه پاتوار [شاد و همکاران [۳]، ۲۰۰۱]، آنالیز پروتئین [کرستر س [۴]، ۱۹۹۰] ، آنالیز اسید چرب [ساسر [۵]، ۱۹۹۰]، آزمایش های بیماری‌زایی روی برگ‌های کولتیوارهای حساس آلو و هلو [ریتچی و همکاران[۶]، ۱۹۹۳] و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی [پاگانی[۷]، ۲۰۰۴] صورت می‌گیرد.

از آنجا که درختان میوه هسته‌دار از اهمیت ویژه‌ای در بین درختان میوه برخوردار هستند، بیماری‌های باکتریایی از جمله بیماری لکه باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در برخی ازمناطق اهمیت خاصی پیدا می‌کند که سبب ایجاد قوانین قرنطینه‌ای در برخی از کشورها برای این پاتوژن شده است. این باکتری بسیاری از درختان میوه هسته‌دار از جمله هلو، آلوی اروپایی، آلوی ژاپنی، گیلاس، زردآلو، بادام و برخی از گیاهان زینتی جنس *Prunus* را مورد حمله قرار می دهد. خسارت این بیماری روی هلو و آلو شدید اما خسارت کمتری روی زردآلو دارد [دوپلزیز[۸]، ۱۹۸۸]. این باکتری سبب خسارت شدیدی در آمریکا، فرانسه و در ایتالیا می‌شود.

روش‌های مولکولی ابزار عمده‌ای در بررسی میکروارگانیسم‌ها می باشند. با کاربرد روش‌های مولکولی می توان درک بهتری از ساختار جمعیتی پاتوژن فراهم آورد. تغییرات نژادی درون جمعیت ممکن است از چندین فاکتور مانند جهش یا نوترکیبی در پاسخ به فشارهای محیطی یا مهاجرت از سایر مناطق جغرافیایی ناشی شود. بنابراین برای انتخاب و گسترش ژن‌های مقاوم نیاز است تا ساختار جمعیتی پاتوژن بهتر درک شود. ساختار جمعیتی به مقدار تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، روابط فیلوژنتیکی درون جمعیت و بین زیر جمعیت‌ها و تقسیم بندی تنوع در مکان و زمان اشاره دارد [لیونگ[۹]،۱۹۹۳] . با بررسی تنوع ژنتیکی می توان مواردی مانند : میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت پاتوژن، عوامل موثر بر تنوع داخل گونه ای عامل بیماری زا، اثر تنوع میزبان روی تنوع ژنتیکی، ارزیابی ساختار ژنتیکی عامل بیماری زا در مکان و زمان، اثرمهاجرت فاکتورهای بیماری‌زا بین جمعیت‌ها را برآورد

1 - Battilani et al.
2- Jami et al.
3- Schaad et al.
4- Kersters et al.
5- Sasser et al.
6- Ritchie et al.
7- Pagani et al.
8- Duplesis
9- Leung

کرد. علاوه بر آن درک بهتر ساختار جمعیتی پاتوژن در زمان و مکان، استفاده از منابع مقاومت در دسترس جهت کنترل بیماری، بررسی تغییرات در ساختار جمعیت در مکان و زمان، درک اثرات ژنوتیپ میزبان، اقلیم و چند کشتی روی تنوع پاتوژنتیکی وتهیه راهبرد مقدماتی برای طراحی راهکارهایی جهت انتخاب منابع مقاومت برای برنامه‌های اصلاحی منطقه‌ای مفهوم کاربردی خواهند داشت [نایاک و همکاران[1]،۲۰۰۸] .

پیشرفت‌های ژنتیکی یک جمعیت و فرایندهای تکاملی یک موجود را می‌توان به دو مرحله اصلی تقسیم کرد. در ابتدا چند شکلی‌های ژنتیکی توسط فرایندهای ژنتیکی چند گانه مانند جهش و نو ترکیبی و انتقال افقی ژن در جمعیت تجمع یافته‌اند. این چند شکلی‌ها سپس در معرض فشارهای تکاملی شامل انتخاب و انتقال ژن قرار می‌گیرند و سرانجام ثابت و یا از جمعیت‌ها حذف می‌شوند. توانایی سازگاری گونه‌های خاص به یک تغییر محیطی، وابسته به سطح چند شکلی ژنتیکی آن است. پاتوژن‌های باکتریایی و میزبان‌هایشان باهم رابطه متقابل دارند. طی این روند دارا بودن سطح بالایی از تنوع ژنتیکی، پایه ای قوی برای پاتوژن-های باکتریایی جهت توسعه قدرت بیماریزایی و غلبه بر سیستم دفاعی میزبان فراهم می سازد. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی پیش نیازی برای درک بهتر مکانیسم تکاملی و پتانسیل پاتوژن‌های باکتریایی می‌باشد [هیو و همکاران[2]،۲۰۰۷] .

درک بیماریزایی این پاتوژن و ویژگی‌های ژنتیکی مرتبط با اکولوژی آن می تواند طراحی‌های استراتژی کنترل بیماری را به صورت کاراتر فراهم کند ، بنابراین روشن کردن اساس ژنتیکی در جهت اختصاص یافتگی میزبانی و بیماری زایی آن با استفاده از اطلاعات کامل ژنوم این عامل بیماری‌زای گیاهی لازم است [پوتیر و همکاران[3]،۲۰۰۹] . در گذشته مجموع روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و فنوتیپی برای شناسایی و طبقه بندی استرین‌ها استفاده می شدند اما امروزه از روش‌های مولکولی به عنوان روش‌های معتبر در مطالعات فیلوژنتیک استفاده می شود [اشنایدر و دی برویجن[4] ، ۱۹۹۶] . با توجه به امکان وجود اختصاص یافتگی میزبانی در بین جدایه‌های این باکتری و از آنجا که تفکیک و تمایز جدایه‌ها با استفاده از روش‌های فنوتیپی و آزمون‌های بیوشیمیایی امکان پذیر نمی‌باشد و تا کنون نیز مطالعه‌ای روی تنوع ژنتیکی آنها انجام نشده است، به منظور بررسی ساختار جمعیتی این باکتری در شمال کشور و بررسی تنوع ژنتیکی این باکتری در جهت اتخاذ روش بیوکنترل بهتر و انتخاب ارقام مقاوم به بیماری لکه باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، این پژوهش به کمک نشانگرهای AFLP صورت گرفت.

1- Nayak et al.
2- Hu et al.
3-Pothier et al.
4-Shnaider and De Bruijn

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- مشخصات گیاه‌شناسی درختان میوه هسته‌دار

درختان میوه هسته‌دار اغلب به جنس گیاهی *Prunus* از خانواده Rosaceae تعلق دارند. در این جنس گیاهی درختان حداکثر تا ارتفاع ۵ متر، خاردار یا فاقد خارند، میوه شفت، گوشتی، آبدار و بر خلاف جنس گیلاس که از همین تیره است سطح آن پوشیده از گرد است و هسته‌ای تخم‌مرغی و یا کروی دارند. برگ‌ها نیز تقریباً پیچ خورده به نظر می‌رسد . تعداد زیادی گونه در این جنس وجود دارد و حداقل بیش از ۱۵گونه آن در جنگل‌های شمال، غرب، نواحی جنوبی، شمال‌شرقی، آذربایجان و بلوچستان انتشار دارند. این جنس ۴۳۰ گونه دارد [قهرمان،۱۳۷۳]. برخی از گونه‌های این جنس عبارتنداز : *P. persica* (هلو)، *P. domestica* (آلوی اروپایی)، *P. salicina*(آلوی ژ اپنی)، *P. avium* (گیلاس)، *P. armeniaca* (زردآلو)، *P. amygdalus* (بادام). این جنس دارای برخی از گونه‌های زینتی هم هست.

۱-۲- سطح زیر کشت و عملکرد درختان هسته‌دار در ایران و جهان

سطح زیر کشت درختان هسته‌دار بر اساس تخمین سازمان FAO[1] در سال ۲۰۰۸ در جهان ۸۳۳۰۹ هکتار بوده است و عملکرد آن ۵۵۹۷۰ کیلوگرم در هکتار بوده‌است و در سال ۴۶۶۲۸۵ تن محصول در جهان تولید می شود. سطح زیر کشت درختان هسته‌دار در ایران ۳۵ هزار هکتار بوده‌است و عملکرد متوسط آن در ایران ۴۸۵۷۱ کیلوگرم در هر هکتار بوده‌است و مقدار کل آن در ایران حدود ۱۷۰ هزار تن در سال گزارش شده‌است.

۱-۳- بیماری‌های مهم درختان هسته‌دار

بنا به گزارش APS[2] از بیماری‌های مهم قارچی درختان هسته‌دار می‌توان به پوسیدگی قهوه‌ای با عامل *Monilinia fructicola* و *M. laxa*، پیچیدگی برگ هلو با عامل *Taphrina deformans*، بیماری لکه غربالی با عامل *Wilsonomyces carpophilus*، سفیدک سطحی با عامل *Podosphaera clandestina* ، پوسیدگی طوقه و ریشه در اثر گونه‌های مختلف *Phytophthora*، جرب[3] با عامل *Cladosporium carpophilum*، پوسیدگی‌های ریشه در اثر *Clitocybe tabescens* و *Armillaria mellea* و *Rosellinia necatrix*، پژمردگی ورتیسلیومی با عامل *Verticillium dahliae* ، شانکر سیتوسپورایی با عامل *Cytospora cincta* و *C.leucostoma* ، شانکر با عامل *Ceratocystis fimbriata* اشاره کرد. از مهم ترین بیماری های باکتریایی می توان شانکر باکتریایی درختان هسته‌دار با عامل *Pseudomobas syringae* pv. *syringae* ، لکه باکتریایی

1- Food and Agriculture Organization of the United Nations
2- American Phytopathological Society
3- Scab

درختان هسته‌دار با عامل *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*، گال طوقه با عامل *Agrobacterium tumefaciens* را نام برد. گونه‌هایی از نماتد *Meloidogyne* هم سبب آسیب به این درختان می‌شوند. ویروس‌ها سبب به وجود آمدن علایمی مانند موزاییک در هلو، سوراخ شدگی ساقه و غیره در این درختان می‌گردد. بیماری آبله آلو(Plum pox یا Sharka) از بیماری‌های مهم ویروسی درختان هسته‌دار بوده و بیماری جاروی جادوگر[1] در اثر یک فیتوپلاسما[2] در این درختان دیده می‌شود.

۱-٤- بیماری‌های باکتریایی درختان میوه هسته‌دار

باکتری‌های متعددی روی درختان میوه هسته‌دار بیماریزا هستند از جمله : *Agrobacterium rhizogenes, A. tumefaciens*, *P. syringae* pv. *mors-prunorum* , *Pseudomonas amygdale, P. syringae* pv. *persicae* و *P.syringae* pv. *syringae*. یکی از بیماری‌های مهم درختان میوه هسته‌دار به ویژه در اروپا بیماری لکه برگی ناشی از باکتری *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* می باشد. این باکتری متعلق به جنس *Xanthomonas* است، که بسیاری از گونه های این جنس پاتوژن گیاهی هستند. از روش‌های متعددی برای شناسایی این باکتری‌ها استفاده می‌شود، از جمله استفاده از محیط کشت‌های انتخابی که به ویژه در مورد جنس *Agrobacterium* کاربرد دارد. کاربرد روش‌های مولکولی برای شناسایی اخیرا رایج شده است که البته این روش‌ها برای جنس *Pseudomonas* بسیار کم و غیراختصاصی هستند. از روش‌های سرولوژیکی به علت عدم وجود آنتی بادی‌ها به صورت تجاری چندان در شناسایی این باکتری‌ها استفاده نمی شود [لوپز و همکاران[3]، ۲۰۱۰].

1-Witches broom
2-Phytoplasma
3-Lopez et al.

۱-۵- بررسی تاکسنومی جنس *Xanthomonas*

در مطالعات اولیه تاکسنومی چند بعدی در جنس *Xanthomonas* مطالعات هیبریداسیون DNA- DNA انجام می‌شده است[واترین و همکاران،۱۹۹۰]. بر اساس روش هیبریداسیون DNA- DNA در سطح ۷۰ درصد در جنس *Xanhomonas*، ۲۰ گروه همولوژی مشاهده شد [واترین و همکاران،۱۹۹۵]. در مطالعه‌ای که توسط انگشت‌نگاری DNA به کمک روش AFLP [1]و rep-PCR [2] در گونه‌ها و پاتوارهای جنس *Xanthomonas* صورت گرفت، مشخص شد که اطلاعات حاصل از این آنالیزها با اطلاعات حاصل از روش هیبریداسیون DNA منطبق است، اما در گروه ۹ همولوژی DNA (*X. axonopodis*) بر اساس روش انگشت‌نگاری rep-PCR ، ۶ کلاسترگزارش شد، که کلاسترهای مشابهی نیز با روش انگشت‌نگاری AFLP در این گروه مشاهده می‌شود. تمام پاتوارهای *X. arboricola* در گروه ۴ همولوژی DNA-DNA توسط واترین قرار گرفته اند [رادماکر[3]و همکاران،۲۰۰۰]. پارکینسون و همکاران[4] [۲۰۰۹] یک قالب طبقه‌بندی جامع به وسیله توالی یابی از ژن gyr B در این جنس به وجود آوردند. جالب این است که ارتباط معنی داری بین درصد همولوژی DNA و درصد شباهت توالی gyr B وجود دارد، حتی پاتوارهای *X. arboricola* هم به وسیله توالی‌یابی از ناحیه gyr B طبقه بندی شده‌اند.

۱- ٦- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Xanthomonas* Dowson, 1939

این باکتری، گرم منفی، میله‌ای، هوازی است. یک تاژک قطبی دارد و اندازه سلول‌ها ۱/۸ * ۰/۷- ۰/۷ * ۰/۴ میکرومتر می-باشد. کلنی‌های این باکتری مخاطی، محدب و روی محیط کشت YDCA[5] به رنگ زرد هستند. این جنس متعلق به خانواده Xanthomonadaceae می باشد. بیشتر آنها مقدار زیادی از یک پلی ساکارید خارج سلولی به نام زانتان[6] در محیط‌های حاوی گلوکز تولید می‌کنند و غشا خارجی نیز رنگدانه زانتومونادین[7] تولید می‌کندکه در آب غیر قابل حل بوده اما در اتر نفتی، متانول و بنزن محلول است. بالغ بر صد گونه این جنس به عنوان پاتوژن گیاهی شناخته شده‌است [شاد و همکاران، ۲۰۰۱]. باکتری‌های متعلق به این جنس همیشه همراه با گیاهان هستند اما همیشه بیماری‌زا نیستند. این جنس همراه با ۲۴۰ جنس گیاهی از ۶۸ خانواده گیاهی

1- Amplified fragment lengh polymorphism
2- Repetitive sequence-based polymerase chain reaction
3- Rademaker et al.
4- Parkinson et al.
5 -Yeast extract, Dextrose, Calcium carbonate, Agar
6 -Xanthan
7 -Xanthomondin