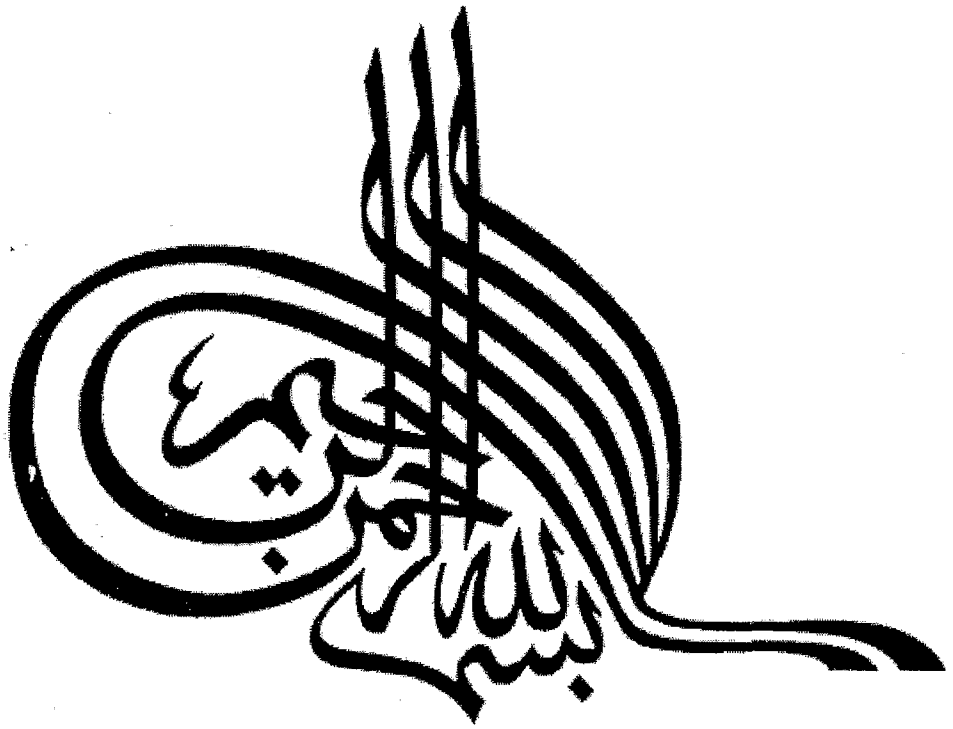


۱۳۸۲۰۳_۲۰۰۶۹۵۱

دانشگاه مازندران
دانشکده علوم زراعی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

موضوع:

بررسی تنوع مولکولی جدایه های *Pesudomonas syringae* pv. *syringae* (عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار) در چند استان شمالی کشور (اردبیل، خراسان رضوی، گیلان و مازندران)

استاد راهنما:
دکتر حشمت الله رحیمیان

استاد مشاور:
دکتر محمد علی تاجیک قنبری

تحقیق و نگارش:
واله عباسی

۱۳۸۸/۱۰/۷

آبان ماه ۱۳۸۸

۱۲۸۲۰۳

سپاسگذاری

سپاس مخصوص آفریدگاری را سزاست که ما را به مسیر فراگیری دانش و بهره‌گیری از گنجینه علم و معرفت رهنمون و توفیق دستیابی به مجهولات را به ما ارزانی داشت و ما را در این راه پر پیچ و خم توان و یاری بخشید. امروز که با استعانت و عنایات حضرت حق تدوین این رساله به پایان رسید بر خود واجب می‌دانم از تمامی اساتید و بزرگواران که در به فرجام رسیدن این مهم مرا یاری داده و همواره پشتیبان و مشوق من بوده‌اند کمال تشکر و قدردانی را بنمایم. پس از تواضع در برابر آستان خالق متعال، بر دستان پدر و مادرم بوسه می‌زنم که رنج دوران تحصیل مرا تحمل نموده و گذر از این سرمنزل را برایم میسر گردانیدند و همواره مشوق من در فراگیری علم و دانش بودند. از مقام شامخ استاد گرانمایه و حاذق جناب آقای **پروفسور رحیمیان** که در نهایت لطف و بزرگواری همواره مرا مشمول راهنمایی‌های مدبرانه خود قرار داده‌اند و در پیچ و خم‌های دشوار این تحقیق پشتیبان من بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد گرانقدر و فرهیخته جناب آقای **دکتر تاجیک** که در سمت مشاور بر بنده منت گذارده‌اند و افتخار شاگردی را به اینجانب اعطا نموده‌اند نهایت تشکر را دارم. از اساتید محترم داوری جناب آقای دکتر بابائی‌زاد و جناب آقای دکتر برزگر و نیز ناظر محترم تحصیلات تکمیلی جنای آقای دکتر مهدیان به خاطر زحماتی که نسبت به داوری این پایان‌نامه کشیدند سپاسگذاری می‌کنم. ازمساعدت‌های جناب آقای دکتر خدایگان و خانم دکتر بقایی که همواره با راهنمایی‌های ذیقیمت خویش اینجانب را مرهون محبت‌های خود قرار دادند سپاسگزارم.

در نهایت از تمامی دوستان بسیار عزیزم آقایان مهندس حاج محمدحسن ملکی، ایوب حیدرزاده، ابوالفضل لطفی، مهدی عارف‌راد، کربلایی‌کیومرث روح‌رضی، بهنام صداقتی، اصغر ابراهیمی، سیدمجید موسوی، مصطفی رضایی، نورالدین حسین‌پور، یعقوب صفدری، حمید دهقان، یاسر یعقوبیان، مشهدی پیمان سلیمانی، محمد علوی، احسان شکری، میعاد کیا، محمود عضدی، بیژن سلیمانی، کاک‌حسن بانه، حشمت‌اله عقبی‌طلب، محسن مرادی، بهزاد ایمانی و خانم‌ها مهندس معصومه صفدری، رقیه شریفی که در تمامی مراحل مرا از لطف بی‌شائبه‌شان دریغ نکردند، بی‌نهایت سپاسگزاری می‌نمایم.

تقدیم به:

تمامی رهپویان راه علم و معرفت

که به حکایت ن و قلم و آنچه می‌نگارد معترفند

چکیده

باکتری (*Pss*) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بیماری‌های متعددی روی محصولات زراعی و باغی می باشد یکی از مهمترین بیماری‌های ناشی از این باکتری شانکر، لکه برگی و نکروز پوست در درختان میوه هسته دار (هلو، شلیل، زردآلو، آلو و گیلاس) است. به منظور بررسی همسانی یا تنوع جدایه های عامل شانکر و لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، طی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۸ نمونه برداری از باغ‌های درختان میوه هسته دار واقع در مناطق مختلف استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی صورت گرفت. علائم بیماری در درختان آلوده به صورت زخم‌های نکروزه، ترشح صمغ روی جوانه‌ها، سرشاخه‌ها و تنه مشاهده گردید. جهت جداسازی عوامل بیماریزای باکتریایی، نمونه‌ها از بافت‌های آلوده جوانه، برگ، شاخه و تنه تهیه و در آب مقطر در تشتک استریل خرد شده و ۱۰۰میکرولیتر از عصاره به دست آمده روی محیط‌های NA، YDC و KB کشت داده شد و تک پرگنه‌های در حال رشد انتخاب و خالص سازی گردیدند. باکتری‌های جداشده بر اساس آزمون‌های گروه LOPAT و GATTa، *Pss* شناسایی شدند. در کل ۷۰ جدایه به دست آمده مورد بررسی‌های فنوتیپی (مورفولوژیکی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی) و الکتروفورز پروتئین محلول سلولی (SDS-PAGE) قرار گرفتند. جدایه‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپی و الگوی پروتئین‌های سلولی اختلافات جزئی نشان دادند. به منظور ارزیابی دامنه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pss*، DNA ژنومی استخراج و در واکنش زنجیره ای پلیمراز با روشهای ERIC، REP و BOX-PCR (rep-PCR) به کار برده شدند. محصول‌های تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش UPGMA و نرم افزار NTSYS-pc برای آنالیز خوشه‌ای استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده نشان داد که در ERIC-PCR در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه‌ها به ۸ گروه، با REP-PCR به ۵ گروه و در BOX-PCR به ۷ گروه و با ترکیب همه آغازگرها به ۹ گروه تقسیم شدند. نتایج نشانگر وجود تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های *Pss* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته دار بود.

کلمات کلیدی: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، تنوع ژنتیکی، rep-PCR، درختان میوه هسته دار

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

مقدمه

۱- گیاهشناسی درختان میوه هسته‌دار ۱

۲- بیماری‌های مهم درختان میوه هسته‌دار ۱

۲-۱- بیماری‌های قارچی ۱

۲-۲- بیماری‌های ویروسی ۲

۲-۳- بیماری‌های باکتریایی ۲

۳- بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ۲

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- خصوصیات باکتری جنس *Pseudomonas* ۶

۱-۲- طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* ۷

۱-۲-۱- شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* براساس خصوصیات بیوشیمیایی ۷

۱-۲-۲- خصوصیات بیوشیمیایی گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1902 ..... ۸

۱-۲-۳- خصوصیات بیوشیمیایی پاتووار *P. syringae* pv. *syringae* ۸

۱-۲-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی *P. syringae* ۱۰

۱-۲-۵- خصوصیات باکتری‌شناسی پاتووار *P. syringae* pv. *syringae* ۱۱

۱-۲-۶- موقعیت تاکسونومیکی *P. syringae* pv. *syrigae* ۱۱

۱-۳- ساختار ژنومی *P. syringae* pv. *syringae* ۱۲

۱-۳-۱- معرفی DNA پلاسمیدی در *P. syringae* pv. *syringae* ۱۲

۱-۴- علائم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار ۱۳

۱-۵- توکسین‌های تولید شده توسط *P. syringae* pv. *syringae* ۱۵

۱-۶- فعالیت هسته یخی در *P. syringae* pv. *syringae* ۱۶

۱-۷- جدایه‌های مقاوم به ترکیبات مسی و استرپتومایسین ۱۷

۱-۸- بررسی اختصاص‌یافتگی میزبانی در *P. syringae* pv. *syringae* ۱۸

۱-۹- تنوع ۱۹

۱-۹-۱- تنوع در *P. syringae* pv. *syringae* ۲۰

۱-۹-۲- اندازه‌گیری تنوع در *P. syringae* pv. *syringae* ۲۱

۱-۹-۲-۱- روش‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های بیماری‌زایی گلخانه‌ای ۲۱

۱-۹-۲-۲- بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی ۲۲

۱-۹-۳- نشانگر RFLP ۲۲

۱-۹-۴- نشانگر AFLP ۲۳

عنوان	صفحه
۱-۹-۵- نشانگر RAPD	۲۴
۱-۹-۶- PCR عناصر تکرارشونده (rep-PCR)	۲۵
۱-۱۰- بررسی تنوع ژنتیکی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* با استفاده از rep-PCR	۲۸
فصل دوم: مواد و روش ها	
۲-۱- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های باکتریایی	۳۱
۲-۲- خالص سازی جدایه‌ها	۳۱
۲-۳- نگهداری جدایه‌ها	۳۲
۲-۳-۱- نگهداری جدایه‌ها در آب مقطر استریل	۳۲
۲-۳-۲- نگهداری جدایه‌ها در پتری حاوی محیط کشت	۳۲
۲-۴- اثبات بیماری‌زایی	۳۲
۲-۵- آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی	۳۳
۲-۵-۱- آزمون استفاده از کربوهیدرات‌ها	۳۳
۲-۵-۱- آزمون زیست‌سنجی تولید توکسین	۳۴
۲-۵-۲- آزمون تشکیل هسته یخ	۳۴
۲-۶- استخراج پروتئین از جدایه‌ها	۳۵
۲-۷- الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید	۳۵
۲-۷-۱- محلول پایه آکریل‌آمید ۳۰درصد و متیلن بیس آکریل‌آمید ۰/۸درصد	۳۵
۲-۷-۲- بافر ژل جداکننده	۳۶
۲-۷-۳- بافر ژل متراکم‌کننده	۳۶
۲-۷-۴- بافر الکترود	۳۶
۲-۷-۵- تهیه ژل جداکننده ۱۲ درصد	۳۶
۲-۷-۶- تهیه ژل متراکم‌کننده ۵ درصد	۳۶
۲-۷-۷- الکتروفورز و ردیابی و ظهور باندها به روش استنلی و مالوی	۳۷
۲-۷-۸- ترسیم دندروگرام براساس الگوهای پروتئینی	۳۷
۲-۸- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)	۳۸
۲-۸-۱- استخراج DNA ژنومی	۳۸
۲-۸-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA	۳۸
۲-۹- بهینه‌سازی PCR برای تکثیر	۳۹
۲-۹-۱- آغازگرها	۴۱
۲-۹-۲- dNTPs	۴۱
۲-۹-۳- کلرید منیزم	۴۱

عنوان	صفحه
۲-۹-۴- بافر PCR (10X)	۴۱
۲-۹-۵- آنزیم Taq DNA Polymerase	۴۲
۲-۱۰- الکتروفورز محصولات PCR	۴۲
۲-۱۱- آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی براساس انگشت‌نگاری ژنومی	۴۲
فصل سوم: نتایج	
۳-۱- جداسازی باکتری ها	۴۴
۳-۲- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها	۴۴
۳-۳- آزمون بیماری‌زایی	۴۷
۳-۴- تولید توکسین در جدایه‌های باکتریایی	۴۸
۳-۵- نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها و ترسیم دندروگرام	۴۹
۳-۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	۵۲
۳-۶-۱- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ERIC-PCR	۵۲
۳-۶-۲- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR	۵۶
۳-۶-۳- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از REP-PCR	۵۹
۳-۶-۴- آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از سه روش ERIC، BOX و REP-PCR	۶۲
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری	۶۴
پیشنهادات	۶۹
فهرست منابع	۷۰

عنوان صفحه

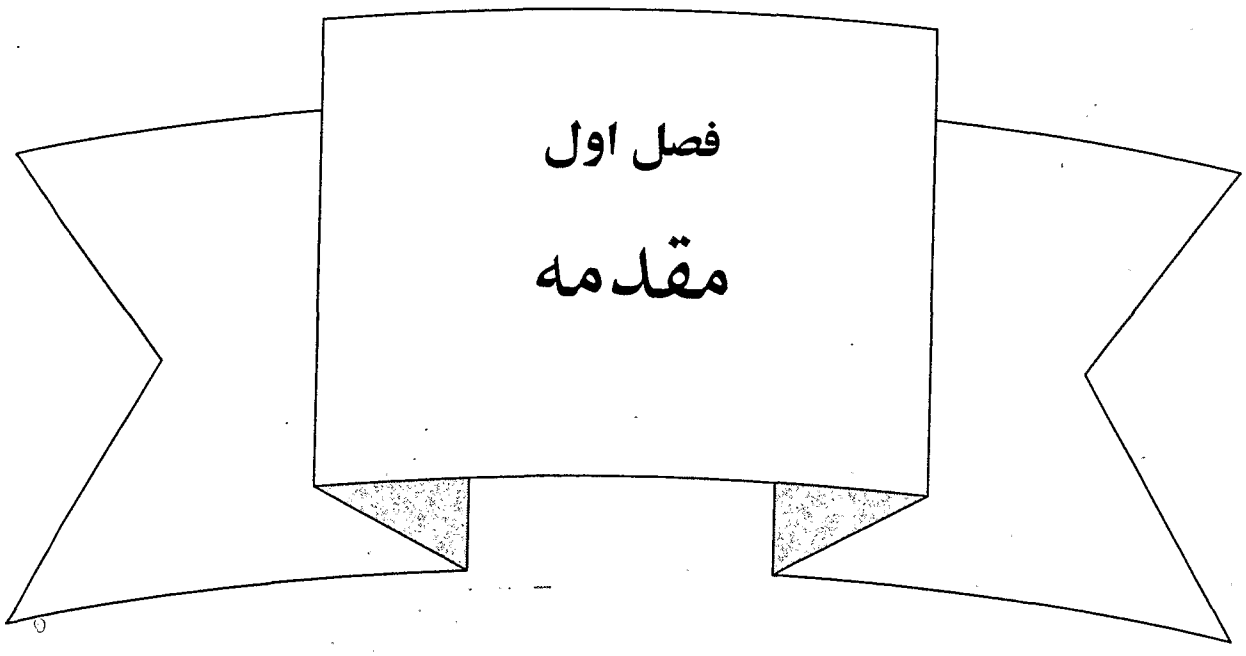
جدول ۱-۱- خصوصیات بیوشیمیایی گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1902 ..... ۹
جدول ۱-۲- خصوصیات بیوشیمیایی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۱۰
جدول ۲-۱- مواد لازم و مقدار هریک برای تهیه محلول پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ۳۹
جدول ۲-۲- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای ذکر شده..... ۴۰
جدول ۲-۳- نام و توالی آغازگرها..... ۴۱
جدول ۳-۱- مشخصات جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار..... ۴۵
جدول ۳-۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار در ۴ استان تحت مطالعه..... ۴۶
ادامه جدول ۳-۲..... ۴۷

عنوان صفحه

شکل ۱-۱- علائم بیماری حاصل از *Pss* درختان میوه هسته‌دار ۱۴
شکل ۳-۱- نتایج آزمون بیماری‌زایی روی نهال هلو ۴۸
شکل ۳-۲- الگوی پروتئینی براساس الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۵۰
شکل ۳-۳- دندروگرام ترسیم شده براساس الگوهای پروتئینی مربوط به جدایه‌ها ۵۱
شکل ۳-۴- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ERIC-PCR با آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 ..... ۵۴
شکل ۳-۵- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR ۵۵
شکل ۳-۶- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR با آغازگر BOXA1R ۵۷
شکل ۳-۷- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از BOX-PCR ۵۸
شکل ۳-۸- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از REP-PCR با آغازگرهای REP1R و REP2 ..... ۶۰
شکل ۳-۹- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از REP-PCR ۶۱
شکل ۳-۱۰- دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC، BOX و REP-PCR ۶۳

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	
۱- گیاهشناسی درختان میوه هسته‌دار	۱
۲- بیماری‌های مهم درختان میوه هسته‌دار	۱
۲-۱- بیماری‌های قارچی	۱
۲-۲- بیماری‌های ویروسی	۲
۲-۳- بیماری‌های باکتریایی	۲
۳- بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار	۲
فصل اول: بررسی منابع	
۱-۱- خصوصیات باکتری جنس Pseudomonas	۶
۱-۲- طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های Pseudomonas	۷
۱-۲-۱- شناسایی گونه‌های Pseudomonas براساس خصوصیات بیوشیمیایی	۷
۱-۲-۲- خصوصیات بیوشیمیایی گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1902	۸
۱-۲-۳- خصوصیات بیوشیمیایی پاتووار *P. syringae* pv. *syringae*	۸
۱-۲-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی *P. syringae*	۱۰
۱-۲-۵- خصوصیات باکتری‌شناسی پاتووار *P. syringae* pv. *syringae*	۱۱
۱-۲-۶- موقعیت تاکسونومیکی *P. syringae* pv. *syrigae*	۱۱
۱-۳- ساختار ژنومی *P. syringae* pv. *syringae*	۱۲
۱-۳-۱- معرفی DNA پلاسمیدی در *P. syringae* pv. *syringae*	۱۲
۱-۴- علائم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار	۱۳
۱-۵- توکسین‌های تولید شده توسط *P. syringae* pv. *syringae*	۱۵
۱-۶- فعالیت هسته یخی در *P. syringae* pv. *syringae*	۱۶
۱-۷- جدایه‌های مقاوم به ترکیبات مسی و استرپتومایسین	۱۷
۱-۸- بررسی اختصاص‌یافتگی میزبانی در *P. syringae* pv. *syringae*	۱۸
۱-۹- تنوع	۱۹
۱-۹-۱- تنوع در *P. syringae* pv. *syringae*	۲۰
۱-۹-۲- اندازه‌گیری تنوع در *P. syringae* pv. *syringae*	۲۱
۱-۹-۲-۱- روش‌های بیوشیمیایی و آزمون‌های بیماری‌زایی گلخانه‌ای	۲۱
۱-۹-۲-۲- بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی	۲۲
۱-۹-۳- نشانگر RFLP	۲۲
۱-۹-۴- نشانگر AFLP	۲۳


فصل اول
مقدمه

۱-گیاهشناسی درختان میوه هسته‌دار

درختان میوه هسته‌دار اغلب بومی مناطق معتدله هستند و چند گونه آن که در منطقه آند[1] آمریکا رشد می‌کنند، متعلق به خانواده گل‌سرخیان، زیرخانواده بادامیان و جنس آلو (Prunus) هستند. این جنس بزرگ شامل هلو، شلیل، آلو، زردآلو، بادام، گیلاس، گوجه‌سبز و گونه‌های زیادی هستند که تعدادی به عنوان گونه‌هایی با میوه‌های خوراکی و برخی به عنوان پایه یا بصورت یک گیاه زینتی بکار می روند. تعداد کروموزوم پایه در این جنس ۸ می‌باشد. گونه‌های مختلف این جنس به صورت درختان یا درخچه‌های خزان‌کننده یا همیشه سبز، با جوانه‌های زمستانه و فلس های روی هم خوابیده زیاد، برگ‌های متناوب، اره‌ای و بندرت با کناره‌های صاف با گوشوارک هستند، گل‌ها منفرد، گروهی یا خوشه‌ای، تعداد کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها هر کدام ۵ عدد، معمولا سفید برخی اوقات صورتی یا قرمز با پرچم‌های فراوان، یک مادگی با خامه طویل، ۳ تخمک ، میوه شفت و معمولا با یک دانه هستند [۹].

۲- بیماری‌های مهم درختان میوه هسته دار

مهم ترین بیماری هایی که تاکنون برای درختان میوه هسته دار ذکر شده اند عبارتند از:

۲-۱- بیماری های قارچی

از جمله بیماری‌های قارچی مهم درختان میوه هسته‌دار می‌توان به زنگ هسته‌داران (*Tranzchelia pruni-spinosa*)، لب شتری هلو (*Taphrina deformans*)، لکه غربالی هسته‌داران (*Stigmina carpophila*)، مونیلیوز (مومیایی شدن) (*Monilia. laxa* و *M. fructigena*)، فتیله نارنجی (-

[1] Andes

(*Cytospora leucostoma*)، گموز (*Phytophthora cactorum*)، سفیدک سطحی (*Sphaerotheca pannosa*) و پژمردگی یا ورتیسیلیوز (*Verticillium dahlia*) اشاره کرد [۱۴].

۲-۲- بیماری های ویروسی

مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی، بیماری آبله‌ای آلو (Plum pox) و لکه حلقوی نکروتیک هسته‌داران (*Prunus* necrotic ring spot) می‌باشد [۱۴].

۲-۳- بیماری‌های باکتریایی

از بیماری‌های مهم باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، می‌توان به شانکر باکتریایی (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) و لکه برگی باکتریایی (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) اشاره کرد[۱۴].

۳- بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار

شانکر باکتریایی که بوسیله پاتووارهای مختلف *Pseudomonas syringae* ایجاد می شود یکی از مشکلات جدی و محدود کننده در احداث و نگهداری باغ‌های میوه هسته‌دار به حساب می‌آید [۹۵]. این باکتری توانایی ایجاد بیماری در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی در چندین جنس غیر وابسته به هم را دارد [۶۳].

شانکر باکتریایی هسته‌داران در تمام مناطق عمده کشت درختان میوه هسته‌دار وجود دارد و به نام‌های بلاست جوانه، بلاست شکوفه، سرخشکیدگی، گموز و بلایت سرشاخه نیز شناخته می‌شود [۱]. این بیماری یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار با خسارتی در حدود ۱۰ الی ۷۵ درصد در باغ های جوان می‌باشد [۱۴]. خسارت این بیماری می‌تواند در نتیجه سرمازدگی شکوفه‌ها یا مرگ جوانه و گلها، زوال درخت و یا در نتیجه توسعه شانکر و مرگ شاخه‌ها و تنه اصلی باشد. باکتری *Pseudomonas syringae* تاکنون از میزبان‌های مختلفی مانند درختان میوه هسته‌دار، سیب، مرکبات، توتون، گندم، ذرت، نیشکر، لوبیا، سورگوم،

گلابی، چغندرقند، کیوی، کدوئیان، برخی گل‌های زینتی و شمار دیگری از گیاهان‌زراعی و علف‌های هرز جدا شده است [۴۹].

سه پاتووار گونه *Pseudomonas syringae* می‌توانند عامل شانکر باکتریائی درختان میوه هسته‌دار باشند:

الف) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*Van Hall. که ممکن است عامل بیماری در هر نوع درخت میوه هسته دار باشد که بصورت تجاری کشت می‌شود.

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

ج) *P. syringae* pv. *persicae* که باعث لکه برگی، شانکر و انگومک میوه هلو در فرانسه و زوال باکتریایی شلیل، هلو، و آلوی ژاپنی در نیوزیلند می‌شود [۱].

از عمده‌ترین بیماری‌های ناشی از *Pss* در ایران می‌توان به شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار[۵]، بلایت گندم و جو [۷] و نوار قرمز نیشکر [۷۶] اشاره کرد.

تا قبل از ۱۹۷۸، اکثر سودوموناس‌های فلورسنت و بیماری‌زای گیاهی به عنوان گونه های مختلف *Pseudomonas* نامگذاری شده بودند ولی در این سال همه به جزء معدودی که به صورت گونه باقی ماندند، به پاتووارهای مختلف گونه *P. syringae* تبدیل گردیدند [۲۴]. اما یانگ و همکاران [۱۱۰] در سال ۱۹۷۸ نخستین بار مفهوم پاتووار را به منظور بهبود وضعیت نامگذاری و سیستم رده بندی باکتری‌ها در سطوح زیر گونه تشریح کردند که بر این اساس گونه *P. syringae* به بیش از ۵۰ پاتووار تقسیم شده است. این تقسیم بندی بر اساس تفاوت در دامنه میزبانی و نوع علائم ایجاد شده توسط باکتری صورت می‌گیرد، بنابراین نمی‌تواند بیانگر روابط ژنتیکی بین پاتووارها باشد [۱۱۰].

پاتووارهای *P.syringae* ویژگی‌های مختلفی از جمله در توانایی ایجاد بیماری روی گیاهان مختلف، نوع علائم ایجاد شده روی گیاه میزبان، اتیولوژی بیماری و توانایی تولید فیتوتوکسین‌ها از یکدیگر متمایز می‌شوند.

وجود تنوع فنوتیپی گسترده نشانگر این است که تفاوت های ژنتیکی زیادی در بین پاتووارهای گونه مذکور وجود دارد که از طریق آزمون‌های معمول قابل شناسایی نیستند [۱۰۴].

پکنولد و گروگن[1] [۷۴] با استفاده از آزمون‌های جفت شدن[2] DNA نشان دادند که *P.syringae* یک گونه هتروژن است، بدین معنی که تفاوت ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین پاتووارهای این گونه وجود دارد. بر اساس مطالعات هیبریداسیون DNA-DNA و RNA ریبوزومی که توسط گاردن و همکاران[3] [۳۸] انجام شد، ۹ گونه ژنومی برای پاتووارهای *P.syringae* و جدایه‌های نزدیک به آنها مشخص شده است. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به همراه پاتووارهای دیگری از جمله *P. s.* pv. *aptata*، *P. s.* pv. *papulans*، *P. s.* pv. *pisi*، *P. s.* pv. *aceris*، *P. s.* pv. *lapsa*، *P. s.* pv. *panici* و *P. s.* pv. *atrofaciens* در گونه ژنومی I طبقه بندی شده‌اند.

مطالعه *P.syringae* pv. *syringae* به منظور شناخت دقیق‌تر عامل بیماری‌زا و همچنین درک رابطه بین بیمارگر و میزبان حائز اهمیت است. شواهد زیادی مبنی بر وجود تخصص یافتگی میزبانی در بین جدایه‌های این باکتری وجود دارد که این مسئله وجود نوعی تنوع ژنتیکی را در بین جدایه‌های *Pss* تقویت می‌کند [۴۲ و ۵۹].

تنوع جدایه‌ها و تفاوت در دامنه میزبانی *Pss* در قرنطینه گیاهی، ارزیابی ارقام از نظر مقاومت به بیماری در برنامه‌های اصلاحی، تشخیص گروه های جدایه‌ها و مطالعه ارتباط بین آنها حائز اهمیت است [۵۱].

در دو دهه اخیر با گسترش استفاده از روش‌های مولکولی، تشخیص، نامگذاری و طبقه بندی پروکاریوت‌های بیماریزای گیاهی دچار دگرگونی شده است و براساس وجود و تکرار توالی‌های کاملا حفظ شده، نیمه حفظ شده و کاملا متغیر ژن‌های باکتریایی، آغازگرهایی طراحی شده اند که در تشخیص کاربرد دارند [۴۴].

توالی‌های تکراری DNA که به طور طبیعی در ژنوم باکتری‌ها پراکنده هستند، می‌توانند به عنوان جایگاهی برای تکثیر DNA ژنومی به کار روند. سه گروه از توالی‌های تکراری که با جزئیات بیشتر مورد مطالعه قرار

[1] Pecknold & Grogen
[2] DNA Hybridization
[3] Garden *et al.*

گرفته‌اند، توالی‌های REP، ERIC و BOX می‌باشند که با طراحی آغازگرهایی براساس این توالی‌های تکراری، متمم‌هایی تحت عنوان REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR ارائه شده اندکه منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنوم می‌گردد. الگوی ژنومی بدست آمده از این روش‌ها باعث تولید و تمایز قطعاتی با اندازه‌های مختلف DNA ژنوم اختصاصی جدایه‌ها می‌شود که به عنوان بارکد برای هر جدایه خاص عمل می‌کند [۶۵]. با توجه به اهمیت *Pss* و امکان وجود اختصاص یافتگی میزبانی در بین جدایه‌های این باکتری و از آنجا که تفکیک و تمایزکامل جدایه‌ها با استفاده از روش‌های فنوتیپی و آزمون‌های بیوشیمیایی امکان پذیر نمی‌باشد و ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شانکر باکتریایی می‌تواند به ارائه یک تاکسونومی استوار و محکم کمک کند و امکان انتخاب جدایه‌ها و استفاده از آنها در مطالعات آینده را فراهم سازد [۱۰۰]. تاکنون مطالعه زیادی روی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف انجام نشده است، بنابراین این پژوهش با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته دار با استفاده از نشانگرهای REP ، ERIC و BOX صورت پذیرفت.

فصل دوم

بررسی منابع

۱-۱- خصوصیات باکتری جنس *Pseudomonas*

جنس *Pseudomonas* اولین بار در سال ۱۸۹۴ توسط Migula پیشنهاد گردید که متشکل از دو واژه Pseudo به معنی کاذب و monas به معنی واحد می‌باشد [۱۶]. این باکتری‌ها دامنه وسیعی از ترکیبات متابولیکی را تولید می‌کنند. برخی از گونه‌ها بیمارگر حیوان و گیاه، برخی بعنوان تنظیم‌کننده رشد گیاه و برخی نیز کنترل‌کننده بیماری‌های خاکزاد هستند [۱۵]. سلول‌های این باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل راست یا خمیده هستند که ضخامت سلول‌های آن کمتر از یک میکرومتر و طول آنها در حدود ۱/۵ تا ۵ میکرومتر بوده و بوسیله یک یا چند تاژک قطبی حرکت می‌کنند و برخی نیز غیر متحرک‌اند. این باکتری‌ها هوازی اجباری بوده و دارای متابولیسم تنفسی هستندکه اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون عمل می‌کند. برخی گونه‌های این جنس قادرند از نیترات به عنوان گیرنده الکترون استفاده کنند. کموارگانوتروف بوده ولی بعضی گونه‌ها کمولیتوتروف اختیاری هستند و از H و CO_2 به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند. اکسیداز متغییر و کاتالاز مثبت هستند. اکثرا فاقد PHB[1] به عنوان اندوخته غذایی هستند، اما ممکن است پلی بتاهیدروکسی آلکانوتز[2] را تحت شرایط معینی تولید کنند که این ترکیب دارای زنجیره طویلی نسبت به PHB می باشد. اغلب گونه‌های این جنس توانایی رشد در شرایط اسیدی (pH:۴-۵) را ندارند. درصد G+C در این باکتری‌ها ۵۷ تا ۶۷ درصد است. گونه تیپ این جنس *P. aueroginosa* می باشد [۲۵].

[1] Poly hydroxyl buteryc acid
[2] Poly betahydroxy alcanotze

۱-۲- طبقه بندی و شناسایی گونه‌های *Pseudomonas*

به منظور تشخیص و شناسایی گونه و پاتووارهای سودوموناس از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها می توان به آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه ای [۷۴]، توانایی فعالیت هسته یخی، باکتریوفاژها[۸۵]، الگوی اسیدهای چرب، الکتروفورز پروتئین [۹۷] و روش‌های مولکولی [۳۸] اشاره کرد.

۱-۲-۱- شناسایی گونه‌های *Pseudomonas* بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی

روش‌های معمول آزمایشگاهی تشخیص پاتووارهای *P. syringae* بر مبنای روش‌های فنوتیپی شامل آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استوار است [۸۶]. هر چند تفاوت اصلی پاتووارهای این گونه در دامنه میزبانی آنهاست، ولی تفاوت‌های دیگری نیز دارند که جهت شناسایی و تشخیص آنها مفید هستند. بر اساس حضور یا عدم حضور آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماکرومولکول‌ها، کاتابولیسم قندها، متابولیسم ترکیبات آروماتیک و کتابولیسم آمینواسیدها، یک سری آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جهت تشخیص *P. syringae* و تفکیک پاتووارهای آن ارائه شده است. از جمله آزمون‌های متداول در تشخیص گونه‌های سودوموناس، آزمون گروه LOPAT است که در تشخیص *P. syringae*، *P. cichorii* و *P. viridiflava* از سودوموناس‌های ساپروفیت همراه گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آزمون LOPAT شامل L: تولید لوان روی محیط سوکروز، O: اکسیداز، P: لهانیدن سیب زمینی، A: آرژنین دی‌هیدرولاز و T: واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون می‌باشد [۶۱].

آزمون سری GATTa (G: ذوب ژلاتین، A: هیدرولیز اسکولین، T: فعالیت تیروزیناز و T: استفاده از تارتارات) نیز برای تمایز *P. syringae* pv. *syringae* و *P. syringae* pv. *morsprunorum* از سایر پاتووارهای این گونه به کار می‌رود [۵۸]. همچنین مشخص شده است که جدایه‌های بیماری‌زای گیاهی از نظر پایین بودن سرعت رشد، عدم توانایی هیدرولیز آرژنین و محدود بودن منابع کربنی مورد استفاده، از دیگر سودوموناس‌های فلورسنت قابل تفکیک می‌باشند. نیز بر اساس این مطالعه مشخص شد که اغلب جدایه‌های