بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به:

مادر مهربانم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودش

به پدرم

که راهی جز راه علم از فرزندانش نطلبید،

گر چه زمانه امان نداد که خود با دستان خویشتن این کتیبه را به پیشگاهش تقدیم کنم

و به خواهران و برادرانم

به پاس قلب های بزرگ و محبت های بی دریغشان

کاشکی هستی زبانی داشتی تا ز هستان پرده ها برداشتی

هر چه گوئی، از دم هستی از آن پردهٔ دیگر بر او بستی بدان

"مثنوی معنوی"

با سپاس از:

همیاری بی دریغ اساتید و دوستان که همواره ره توشه ام بوده است و بدین وسیله مراتب قدردانی و امتنان خود را از همیاری و همفکریشان ابراز می دارم:

جناب آقایان دکتر سید مهدی علوی، مسعود شمس بخش و مسعود سلطانی که جای به جای از راهنمایی و مشاوره اشان در پیشبرد این پایان نامه بهره برده ام؛

مدیریت و اساتید محترم گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، آقایان دکتر میرفخرایی، جلالی، معینی، دهقانی و کریم زاده و نیز سایر اساتیدی که در طول دوران تحصیل افتخار شاگردیشان را داشته ام :آقایان دکتر احمد مجد، بهزاد قره یاضی، ناصر صفایی ، محمد امیر کریمی ترشیزی ، علی سروش زاده، مهرداد میراولیایی و خانم دکتر زهره حمیدی اصفهانی ؛

مدیریت، اساتید و کارشناسان محترم گروه بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری؛

دوستان خوبم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و نیز تمامی همکلاسی های عزیزم در گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

تایید اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیات داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم/آقای رعنا روحانی تحت عنوان:

را از نظر فرم و

محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مسعود شمس بخش دکتر سید مهدی علوی	دانشیار استادیار	
۲- استاد مشاور	—		
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر ابراهیم محمدی گل تپه استاد		
٤- اساتید ناظر: ۱- داخلی	دکتر ناصر صفایی	دانشیار	
۲- خارجی	دکتر مسعود سلطانی	استادیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد/ رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته .....است که در سال ..... در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/ جناب آقای دکتر.....، مشاورهٔ سرکار خانم/ جناب آقای دکتر ..... و مشاورهٔ سرکار خانم/ جناب آقای دکتر..... از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ۴ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب ..رضا روحانی..... دانشجوی رشته ...بیوتکنولوژی.. مقطع .....ارشد.. تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: رضا روحانی

تاریخ و امضاء:

۹۱/۱۱/۱

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب ، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

چکیده

شانکر آسیایی مرکبات از جمله بیماری های قرنطینه ای است که خسارت شدیدی بر تولید مرکبات ایران وارد ساخته و سهم این محصول در صادرات کشاورزی کشور را کاهش داده است. باکتری عامل این بیماری (*Xcici*) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* بر اساس دامنه میزبانی ، با دو پاتوتیپ مشخص شده است: پاتوتیپ A، که قادر به ایجاد علائم بیماری روی کلیه واریته های مرکبات می باشد و پاتوتیپ A* که از نواحی مختلف آسیا و ایران معرفی شده و دارای دامنه میزبانی محدود به لیمو ترش است . این دو پاتوتیپ از نظر ژنتیکی متفاوت هستند اما اساس این تفاوت ژنتیکی نامشخص می باشد . در جنس *Xanthomonas* ژن های متعددی یافت شده اند که در بیماریزایی (pathogenicity) و قدرت تهاجمی (virulence) باکتری های این جنس نقش دارند . از این میان ، می توان به ژن های آویرولانس (*avr*)، فاکتورهای تنظیم گر بیماریزایی (*rpf* regulation of pathogenicity factors) و ژن های دخیل در بیماریزایی و واکنش فوق حساسیت (*hrp*: hypersensitive response and pathogenicity) اشاره نمود. بیماریزایی *Xanthomonas citri* subsp.*citri* ، عامل شانکر آسیایی مرکبات، واغلب باکتریهای فیتوپاتوژن گرم منفی وابسته به سیستم ترشحی تیپ ۳(اینجکتیزوم) است که بیش از بیست وپنج افکتور پروتیین به سلول گیاهی وارد میکند . در این مطالعه، تغییر سطح بیان ۱۶ ژن کاندیدا که در استفرار سیستم ترشحی تیپ۳ و در بیماری زایی *Xanthomonas citri* subsp.*citri* نقش دارند در شرایط درون گیاهی مورد بررسی قرار گرفت . برای تعیین سطح بیان ژنها ی دخیل در بیماریزایی و اختصاصیت میزبانی باکتری، سوسپانسیون باکتریایی (OD=۰.٦) سویه شماره NIGEB-۸۸، جدا شده از لیموترش(*citrus aurantifolia*)، به برگهای گیاه میزبان مایه زنی شد. سلول های باکتری، سپس از برگهای مایه زنی شده در تیمارهای زمانی ۱، ۲ ،۳، ٤ و ۷ روز پس از مایه زنی بازیافت شده و RNA آنها استخراج گردید. آنالیز RT-PCR و Real-Time RT-PCRبا استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ۱٦ ژن کاندیدا جهت تعین سطح بیان این آنها انجام گرفت. داده های آزمایشی مبین وجود تفاوت در سطح تظاهر ژنهای مورد بررسی در زمانهای مختلف پس از مایه زنی بود . این نتایج بر این دلالت دارد که ژنهای مورد مطالعه در زمانهای متفاوتی پس از مایه زنی بیان می شوند که هر دو دسته این ژ نها معرفی شده اند. این داده ها میتوانند فهم بهتری از بیماریزایی باکتری عامل شانکر آسیایی مرکبات، در سطح مولکولی فراهم کنند که در حقیقت میتواند اساس مطالعات مولکولی آینده در زمینه بر همکنش میزبان-باکتری باشد.

کلمات کلیدی: *Xanthomonas citri* pv. *citri*، شانکر مرکبات، اختصاصیت میزبانی، بیماریزایی، بیان ژن، Real Time RT-PCR

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

فصل اول: مقدمه.....۱

مقدمه.....۲

فصل دوم: بررسی منابع.....۵

۲-۱- تاریخچه کشت مرکبات در ایران.....٦

۲-۲- گیاهشناسی مرکبات.....۷

۲-۳- سطح زیر کشت ومیزان تولید مرکبات در ایران و جهان.....۸

۲-۳-۱ – سطح زیرکشت و میزان تولید مرکبات در جهان.....۸

۲-۳-۲- سطح زیرکشت و تولید مرکبات در ایران.....۸

۲-٤- ارزش غذایی و موارد مصرف مرکبات.....۹

۲-۵- مهم ترین آفات و بیماریهای مرکبات.....۹

۲-۵-۱-آفات.....۹

۲-۵-۲-بیماری ها.....۱۰

۲-۵-۲-۱- بیماریهای قارچی.....۱۰

۲-۵-۲-۳- بیماریهای ناشی از عوامل پروکاریوتی بیماریزا در مرکبات.....۱۰

۲-۵-۲-٤- بیماریهای ناشی از نماتود.....۱۱

۲-٦- منشا و تاریخچه بیماری شانکر باکتریایی مرکبات.....۱۱

۲-۷-علائم بیماری و خسارت.....۱۱

۲-۸- خصوصیات عامل بیمارگر..... ۱۲

۲-۸- چرخه زندگی عامل بیماری.....۱۲

۲-۹- تاکسونومی و تشریح فرم های مختلف عامل شانکر باکتریایی مرکبات.....۱۳

۲-۱۰-دامنه میزبانی باکتری.....۱٤

۲-۱۱- سیستم های ترشحی در باکتریهای بیماریزا.....۱۷

۲-۱۱-۱- سیستم ترشحی نوع I (T۱SS: Type I secretion system).....۱۹

۲-۱۱-۲- سیستم ترشحی نوع II (T۲SS: Type II secretion system).....۱۹

۲-۱۱-۳- سیستم ترشحی نوع III (T۳SS: Type III Secretion System).....۲۰

۲-۱۱-٤- سیستم ترشحی نوعIV (T٤SS: Type IV secretion system).....۲۰

۲-۱۱-٥- سیستم ترشحی نوعV (T٥SS: Type V secretion system).....۲٤

۲-۱۱-٦- سیستم ترشحی نوع VI (T٦S : Type VI secretion system) ۲٤

۲-۱۲- ژنهای دخیل در بیماریزایی و قدرت تهاجمی *Xanthomonas* ها.....۲٥

۲-۱۳- بررسی سطح تظاهر ژنها به کمک تکنیک **آرتی- پی سی آر**(RT-PCR).....۲٥

۲-۱٤- بررسی سطح تظاهر ژنها به کمک تکنیک Real- Time PCR.....۳۲

۲-۱٤-۱- روشهای سنجش با Real- Time PCR ۳۳

۲-۱٤-۲- روش سنجش غیر اختصاصی یا Non specific format..... ۳٤

۲-۱٤-۳-روشهای تعیین کمیت با Real time PCR..... ۳٤

۲-۱٤-۳-۱-تعیین کمیت به روش مطلق یا Absolute Quantification..... ۳٦

۲-۱٤-۳-۲- تعیین کمیت به روش نسبی یا Relative Quantification ۳٦

فصل سوم: مواد و روش ها..... ٤۲

۳-۱- مواد گیاهی و بهینه سازی روش تلقیح گیاه میزبان..... ٤۳

۳-۲- انتخاب سویه باکتریایی، تهیه مایه تلقیح و مایه زنی گیاه میزبان..... ٤٤

۳-۳- بازیافت باکتری از برگ های مایه زنی شده..... ٤٥

۳-٤- تست توده سلولی برای اطمینان از عدم وجود آلودگی های میکروبی..... ٤٦

۳- ٤-۱- کشت توده سلولی ٤٦

۳-٤-۲- انجام PCR با استفاده از آغازگر XAC F/R..... ٤٦

۳-٥- استخراج RNA کل از سلول باکتری ٤۷

۳-٥-۱- بررسی RNA استخراج شده..... ٤۹

۳ -٥-۲-تیمار RNA با آنزیم DNase..... ٤۹

۳-٦-واکنش آرتی پی سی آر (RT-PCR)..... ٤۹

۳-٦-۱- سنتز cDNA ٥۱

۳-٦-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)..... ۵۱

۳-۷- انتخاب آغازگرها.....۵۲

۳-۸- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز.....۵۳

۳-۹-آزمون Real time PCR ۵۵

۳-۱۰-کنترل های Real time PCR ۵٦

۳-۱۱- تفسیر نتایج در Real time PCR.....۵۷

فصل چهارم: نتایج.....**۵۸**

٤-۱- مایه زنی برگهای گیاه میزبان به دو روش تزریق باکتری و اسپری باکتری بر روی برگ.....۵۹

٤-۲- استخراج باکتری از برگ های مایه زنی شده.....٦۰

الف- کشت توده سلولی..... ..... ٦۱

ب- انجام پی سی آر با آغازگر XacF/R.....٦۲

٤-۳-ساخت cDNA ٦۳

٤-۳-۱- استخراج RNA ٦۳

٤-۳-۲- واکنش نسخه برداری معکوس.....٦۳

٤-٤- آزمون آرتی پی سی آر RT-PCR در شرایط *In vivo*.....٦۵

٤-۵- آزمون آرتی پی سی آر RT-PCR در شرایط *In vitro*..... ٦۷

٤-٦- آزمون Real-time PCR ٦۸

فصل پنجم: بحث **۷٤**

۵-۱- بحث ۷۵

۵-۲- نتیجه گیری ۸۳

۵-۳- پیشنهادات ۸٤

فصل ششم: منابع **۸۵**

فهرست جداول

عنوان.....صفحه

جدول۲-۱- **بیماریزایی فرم های مختلف شانکر روی چهار گونه از مرکبات**.....۱۸

جدول۲-۲- مقایسه دو روش RT-PCR یک مرحله ای و دو مرحله ایی.....**۳۳**

جدول ۲-۳- روش های سنجش با Real-time PCR.....۳٤

جدول ۳-۱: مواد لازم جهت انجام PCR.....۵۳

جدول ۳-۲- توالی و مشخصات الیگونوکلئوتیدهای ژن های هدف و ژن مرجع.....۵٤

جدول۳-۳: مواد لازم جهت انجام Real time PCR.....۵٦

جدول٤-۱- مقایسه کارایی دو روش ساخت cDNA ٦٦

جدول٤-۲- محاسبه سیکل آستانه (Ct) و $\log_2 F$ جهت ژنهای کاندید در بیماریزایی سویه NIGEB-088، از تیپ بیماریزایی*A-*Xcici* در شرایط *In vivo* در واکنش qRT- PCR. ۷۲

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۲-۱- شکل شماتیک فلاژلا (a) و اینجکتیزوم در باکتریهای پاتوژن گیاهی..... ۲۱

شکل ۲-۲- هارپین پیلوس در باکتریهای پاتوژن گیاهی(A) و کمپلکس سوزنی در باکتریهای پاتوژن جانوری 23

شکل۲-۳. شکل شماتیک کلاستر ژنی *hrp* در *X. campestris* pv. *vesicatoria* (گروه۲) و *P. syringa* pv.*tomato* (گروه۱)..... ۲۷

شکل۲-٤- مدلی برای تنظیم ژن *hrp* و سیستم ترشحی تیپ III در *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ۳۰

شکل۲-۵- شکل۲-٤- نمودار منحنی ذوب (Melt curve) در آزمون Real- time PC به روش غیر اختصاصی.....۳٦

شکل-۲-۵ – نمودار فازهای مختلف یک واکنشPCR.....۳۸

شکل- ۲-٦- چرخه آستانه در یک واکنش Real- time PCR.....۳۹

شکل ۲-۷- رسم منحنی استاندارد در تعیین کمیت به روش مطلق.....٤۰

شکل ۳-۱- نگهداری نهالهای لیموترش در گلخانه جهت آداپتاسیون و بهینه سازی شرایط مایه زنی.....٤۳

شکل ۳-۲- مایه زنی برگ های لیموترش به دو روش تزریق در سطح زیرین برگ (راست) و اسپری باکتری روی برگ ها (چپ)..... ٤۵

شکل٤-۱- مقایسه دو روش مایه زنی تزریق در سطح زیرین برگ (A) و اسپری باکتری روی برگ (B).....۵۹

شکل٤-۲- مقایسه دو روش مایه زنی اسپری باکتری بر روی برگ (A) و تزریق باکتری از طریق سرنگ در سطح زیرین برگ در روز هفتم پس از مایه زنی (B). ٦۰

٤-۳- چگونگی ظهور علائم شانکر باکتریایی مرکبات ناشی از آلوده سازی مصنوعی به روش اسپری.....٦۱

شکل٤-٤- ترتیب ظهور علائم شانکر باکتریایی مرکبات ناشی از آلوده سازی مصنوعی به روش اسپری.....٦۱.

شکل ٤-۵- کشت باکتری بازیافت شده از آپوپلاست گیاه لیموترش مایه زنی شده، روی محیط YPGA و مشاهده تک کلونی های حاصل.....٦۲

شکل ٤-٦- الگوی نوار بندی حاصل از واکنش زنجیره ایی پلیمراز با آغازگر (*Xac(F/R*..... ٦٤

شکل٤-٧- الگوی نواربندی حاصل از RNA استخراج شده از باکتری بازیافت شده از آپوپلاست برگ گیاه میزبان، در روز هفتم پس از مایه زنی، بر روی ژل آگاروز یک درصد..... ٦٧.

شکل٤-٨- الگوی نواربندی حاصل از تکثیر ١٦ آغازگر اختصاصی مربوط به ژنهای کاندید در بیماریزای سویه-NIGEB 088، از تیپ بیماریزایی*A-*Xcici* در آزمایش ***in vivo***، روی ژل آگاروز ٢ درصد..... ٦٨

شکل٤-٩-الگوی نواربندی حاصل از تکثیر ١٦ آغازگر اختصاصی مربوط به ژنهای کاندید در بیماریزایی سویه-NIGEB 088، از تیپ بیماریزایی*A-*Xcici*، در آزمون آرتی پی سی آر، در شرایط ***in vitro***، روی ژل آگاروز ٢ درصد.....٧٢

شکل٤-١٠- مقایسه سطح بیان ١٦ ژن کاندید در بیماریزایی سویهNIGEB-088، از تیپ بیماریزایی*A-*Xcici*، در تیمارهای زمانی مختلف پس از مایه زنی، در واکنش qRT-PCR..... 81

فصل اول

مقدمه

مقدمه

مرکبات یکی از مهمترین محصولات باغی به شمار می رود. کشت و کار این محصول و صنایع وابسته به آن نقش مهمی در اقتصاد مناطق مرکبات خیز ایران ایفا می کند (قزوینی و مقدم، ۱۳۸۵). از لحاظ تولید، کشور ایران مقام هشتم را در میان تولیدکنندگان عمده مرکبات جهان دارد (فائو، ۲۰۰۸). در ایران، سه منطقه اصلی سواحل دریای خزر، ناحیه مرکزی و جنوبی به عنوان مراکز اصلی تولید انواع مرکبات به حساب می آیند (قزوینی و مقدم، ۱۳۸۵). از نقطه نظر تولید محصول، در سال ۸۷ حدود ٤ میلیون و ٦۰۰ هزارتن انواع مرکبات در کشور تولید شده ا ست (آمارنامه کشاورزی ۱۳۸۸). در میان انواع مرکبات تولیدی ایران، لیموترش با تولیدی معادل ٦۱۵.۰۰۰ تن، مقام سروم را پس از پرتقال، با تولید سالیانه ۲.۳۰۰.۰۰۰ تن، و نارنگی، با تولید سالیانه ۷۰۲.۰۰۰ تن، به خود اختصاص داده و در مقیاس جهانی، رتبه ایران را به مقام ششم ارتقا بخشیده است (فائو، ۲۰۰۸). نکته قابل تامل آنست که با وجود شواهد و قرائن فوق، مبنی بر اهمیت مرکبات در اقتصاد کشور و اشتغال زایی، ایران جایگاهی در میان صادرکنندگان جهانی و حتی منطقه ای این محصول ندارد (فائو، ۲۰۰۸). از مهمترین دلایل این امر می توان به پایین بودن کیفیت محصول تولیدی ایران اشاره نمود. عوامل متعددی چون آفات و بیماری های مرکبات در صدر عناصر کاهنده کیفیت مرکبات ایران قرار می گیرند. بیماری شانکر آسیایی مرکبات در کنار جاروک لیموترش از جمله عواملی است که سهم بسزایی در کاهش کیفیت و کمیت تولید لیموترش ایران داشته و سهم این محصول در صادرات کشاورزی کشور را کاهش داده است. بیماری شانکر مرکبات توسط باکتری *Xanthomonas citri* sub. *citri* (*Xcc*)، ایجاد می‌شود. این بیماری برای اولین بار توسط علیزاده و رحیمیان (۱۳٦۸) در ایران گزارش گردید. در سال ۱۳۷۵، با شیوع بیماری در جنوب کشور، اکثر درختان لیموترش این منطقه دچار آسیب شدند (رحیمیان و همکاران،۱۳۷۷). در حال حاضر و به استناد مصوبه

شماره ۱۶۲۸۵۷/ت۴۲۷۱۹ه مورخ ۱۳۸۸/۰۸/۱۶ هیات محترم وزیران، کلیه مناطق مرکبات خیز کشور به جز استان های جنوبی کرمان، فارس، هرمزگان و سیستان و بلوچستان جزء مناطق قرنطینه محسوب می شوند و انتقال هرگونه ماده گیاهی و فرآورده بیولوژیک مرتبط با مرکبات از نواحی جنوبی به این مناطق ممنوع می باشد. این همه، به دلیل آلودگی های باکتریایی ناشی از بیماری شانکر آسیایی مرکبات است که مناطق مرکبات خیز جنوب کشور را در بر گرفته است. این بیماری دارای دو فرم متفاوت است. فرم بسیار بیماریزای این باکتری (تیپ A یا *Xcc*-A) که دامنه میزبانی گسترده ای نیز دارد در اغلب مناطق مرکبات خیز جهان حضور دارد. فرم دیگری از این بیماری با دامنه میزبانی محدود به لیموترش (*Xcc*-A*) در هند، تایلند و خلیج فارس شناسایی شده است. مطالعات صورت گرفته روی کلکسیون جامعی از جدایه های ایرانی این باکتری، بیانگر وجود تنوع ژنتیکی منحصر به فرد در میان آنها است (سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۸۹) و از آنجا که دامنه میزبانی این جدایه ها محدود به لیمو ترش است (Verniere *et al*., 1998) شرایط منحصر به فردی ایجاد گردیده تا این اختصاصیت میزبانی و قدرت بیماریزایی حاد مورد تحقیق قرار گیرد. بیماریزایی (pathogenicity) و قدرت تهاجمی (virulence) باکتری *Xcc*، عموما به فعالیت یک ژن منفرد *pthA* ، مرتبط دانسته شده است (Kanamori and Tsuyumu, 1998; Swarup *et al*., 1991; Swarup *et al*., 1992). اما، رمزگشایی ژنوم سویه *Xcc* -306 در سال ۲۰۰۲، مقدمه ای بر درک صحیح تر ژنتیک بیماریزایی عامل شانکر مرکبات بود (da Silva *et al*., 2002). گزارش Astua-Monge *et al*. (2005) نشان می دهد که علاوه بر *pthA*، ژن های متعدد دیگری نیز در مکانیسم بیماریزایی و قدرت تهاجمی *Xcc* نقش دارند. تاکنون، مطالعات چندان زیادی در باره بیماری شانکر مرکبات در کشور انجام نشده است. عمده پژوهش های انجام گرفته در کشور، محدود به بررسی خصوصیات بیوشیمیایی سویه های ایرانی، بررسی نقش علف های هرز در پراکنش عامل بیماریزا و بررسی تنوع ژنتیک سویه های

ایرانی این باکتری بوده است. همچنین، تحقیقات جهانی اگرچه به بررسی ژنتیک بیماریزایی گونه های مختلف *Xanthomonas* پرداخته اند اما، تا کنون هیچ گزارشی درباره ژن های اختصاصی دخیل در بیماریزایی و اختصاصیت میزبانی سویه های تیپ *A صورت نپذیرفته است . از این رو، اهداف این تحقیق شامل بررسی بیان ژنهای کاندیدای دخیل در بیماریزایی باکتری *Xcc* در شرایط *in vivo*، بعلاوه بررسی بیان کمی این ژنها در بیماریزایی سویه های *A باکتری *Xcc* درتیمارهای زمانی مختلف ، در شرایط *in vivo* به منظور شناسایی زمان مناسب استقرار سیستم ترشحی تیپ III (اینجکتیزوم) باکتری می باشد.

فصل دوم

بررسی منابع