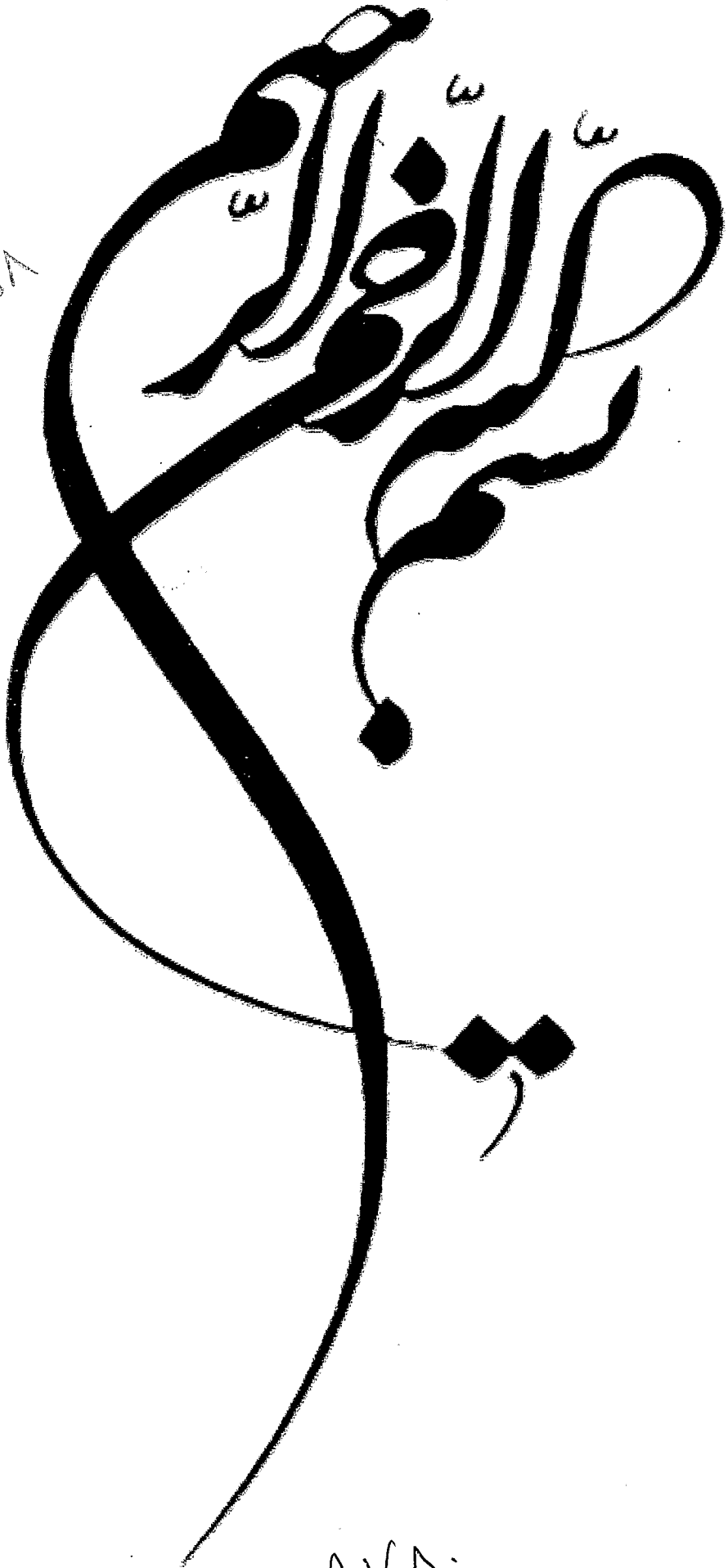

كرسي
٢٥٨
٥ طبرسي
١٠٩٧٨٠

۸۷/۱/۱۰ ۹۳۲۴
۸۷/۱۲/۴

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی

مقایسه ویژگی های مولکولی جدایه های شبیه به *Pseudomonas* *syringae* pv. *syringae* عامل نوار قرمز نیشکر و لکه قهوه ای حبوبات

تحقیق و نگارش:

زهرا کریمی علویجه

استاد راهنما:

دکتر حشمت اله رحیمیان

استاد مشاور:

دکتر مسعود شمس بخش

۱۳۸۷/۱۱/۱۷

بهار ۱۳۸۷

۱۰۹۷۸۰

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهایی پایان نامه خانم زهرا کریمی علویجه تحت عنوان: **مقایسه ویژگی های مولکولی جدایه های شبیه به *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل نوار قرمز نیشکر و لکه قهوه ای حبوبات** را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر حشمت اله رحیمیان	استاد	
۲- استاد مشاور	دکتر مسعود شمس بخش	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر ناصر صفایی	استادیار	
۴- اساتید ناظر	- دکتر ابراهیم پورجم	دانشیار	
	- دکتر ناصر صفایی	استادیار	

دستور العمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آئین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی پیگیری خواهد شد.

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، مبیّن بخشی 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 نگارنده در رشته بیماری شناسی گیاهی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر حشمت اله رحیمیان، مشاورهٔ جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش 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 زهرا کریمی علویجه دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: زهرا کریمی علویجه

تاریخ و امضاء: ۸۷/۲/۱۳

تقدیم به:

اسوه محبت، فداکاری و گذشت، **پدر** عزیزتر از جانم، آنکه جوانی و هستی خود را صرف رفاه و تامین آینده این حقیر نموده و همواره سنگ صبور مشکلات و ناملایمات زندگیم بوده و با تحمل تمام تلخی های زندگی، خالصانه طعم شیرین تحصیل را بر من ارزانی داشتند. از صمیم قلب زحماتش را ارج نهاده و دست های خسته و رنجور از بدعهدی روزگارش را می بوسم.

تقدیم به:

آنکه بوسه بر پاهای خسته و خاک قدمش را افتخار خود می دانم، ***مادر*** دلسوز و مهربانم، کسی که هر چه دارم از دعای خیر او دارم، آنکه در تمام شب های تحصیلم همچون دوران کودکی پرستاریم کرد و روزها با دعایش بدرقه ام نمود. بر چشمان نگرانش بوسه می زنم و عاشقانه دوستش دارم.

و

خواهر عزیزم که لطافت و زیبایی زندگی در فروغ چشمانش برایم معنی می یابد.

سپاس کردگار یکتایی که ذات بی کرانش آکنده از علم و دانش است و چه سخاوتمندانه از این خوان بی همتا موهبتی شگرف ارزانی داشت و دریای کمالات خود را به سوی ما گشود. تدوین این پایان نامه، پس از الطاف الهی، مدیون راهنمایی، مساعدت و همفکری بزرگوارانی می باشد که بی تردید، بدون همراهی آنان، طی این طریق با مشکلات فراوان همراه بود. لذا بر خود لازم می دانم از کلیه سرورانی که در مراحل مختلف این پژوهش مرا یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

از زحمات و راهنمایی های ارزنده و کمک های بی دریغ استاد راهنمای ارجمند، جناب پروفسور رحیمیان، با نهایت احترام سپاسگزاری نموده و صمیمانه ترین تقدیرها را به محضر این استاد بزرگوار و فرزانه تقدیم می نمایم.

از جناب آقای دکتر شمس بخش، استاد مشاور پایان نامه بنده تشکر و کمال امتنان را دارم که با راهنمایی های به جایشان مشاوری صدیق و کارا بودند.

از اساتید محترم داور، جناب آقای دکتر پورجم و آقای دکتر صفایی که با دقت نظر، نظارت بر پایان نامه اینجانب را بر عهده داشتند سپاسگزاری می کنم.

از جناب آقای دکتر محمدی و آقای دکتر علیزاده سپاسگزارم که در طی مدت تحصیلم از کمک های بی دریغ و بی شائبه شان بهره مند بودم.

مراتب سپاس خود را از دوستان عزیز گروه گیاه پزشکی دانشگاه کشاورزی ساری آقای دکتر برزگر، خانم مهندس نیک روش و عربی، آقای رضاییان و آقای اخوتیان ابراز می دارم.

از کارشناسان محترم آزمایشگاه بیماری شناسی تربیت مدرس آقایان ساداتی و وامقی که در فراهم کردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق به اینجانب کمک کرده اند سپاسگزارم.

از کلیه دوستان و سرورانی که در این پژوهش از همراهی آنها بهره مند بوده و لحظات زیستن و آموختن در کنارشان به زیباترین خاطرات بدل شد، خانم ها امینیان، واصبی، دارستانی، بیاتی، یونسی، عباس زاده، موجرلو، بقایی، کریمی، نورانی، منتخبی و آقایان منصوری و میرمجلسی سپاسگزارم.

در پایان از زحمات بیدریغ پدر و مادر عزیزم که سختی دوران تحصیل را صمیمانه پذیرا و همواره مشوقم بودند با نهایت احترام، تشکر و قدردانی می کنم.

چکیده:

باکتری (*Pss*) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* توانایی ایجاد بیماری های متنوعی نظیر شانکر درختان میوه هسته دار، بلاست مرکبات، لکه قهوه ای لوبیا، نوار قرمز نیشکر، بلایت برگی گندم و جو، شانکر باکتریایی کیوی، لکه برگی گیاهچه های فلفل، بلاست سیب و گلابی را دارد. به منظور مقایسه جدایه های *Pss* عامل نوار قرمز نیشکر با جدایه های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته دار، لکه قهوه ای حبوبات، بلاست مرکبات، بلایت گندم و لکه برگی ختمی خواب آلود، الگوی حاصل از تکثیر DNA به روش های rep-PCR ، IS50-PCR و RFLP-PCR با استفاده ازآغازگرهای BOX A-1R، ERIC 1-1R، ERIC 2، REP 1-1R، REP 2، IS50 و ITS1, ITS2 مورد بررسی قرار گرفت. نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA با آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه، جدایه های *Pss* مولد لکه قهوه ای حبوبات را در یک گروه و مستقل از سایر جدایه ها قرار داد. هضم محصولات ITS-PCR مربوط به حبوبات با استفاده از آنزیم های *Msp*I و *Hin*6I و *Taq*I ، نیز نشان داد که این جدایه ها در گروهی متمایز از سایر گروه ها قرار می گیرند.

اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر با rep-PCR و IS50-PCR نشان داد که این جدایه ها از جدایه های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته دار، لکه قهوه ای حبوبات، بلاست مرکبات، بلایت گندم و لکه برگی ختمی خواب آلود متمایز می باشند. همچنین تنوع درون جدایه های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر با استفاده از همه آغازگرها قابل ردیابی بود. نتایج RFLP-PCR (هضم محصولات ITS-PCR با آنزیم های *Msp*I, *Alu*I, *Taq*I و *Hin*6I) نیز با نتایج بررسی های rep-PCR مطابقت داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر از نظر ژنتیکی از جدایه های *Pss* مولد شانکر درختان میوه هسته دار، لکه قهوه ای حبوبات، بلاست مرکبات، بلایت گندم و لکه برگی ختمی خواب آلود متمایز می باشند.

فهرست مطالب

فصل اول ۱

۱-۱ مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع ۷

۲-۱- خصوصیات باکتری شناسی جنس *Pseudomonas* Migula 1894 ..... ۸

۲-۲- خصوصیات گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall ۱۰

۲-۳- فعالیت هسته یخ در گونه *P. syringae* ۱۲

۲-۴- توکسین های تولید شده توسط *P. syringae* ۱۴

۲-۵- ژن های *hrp* و بیماری زایی در *P. syringae* ۱۶

۲-۶- تفکیک پاتوارهای *P. syringae* با استفاده از ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی ۱۷

۲-۶-۱- ویژگی های بیوشیمیایی پاتوارهای *P. syringae* ۱۸

۲-۶-۲- روش های مولکولی جهت تمایز پاتوارهای *P. syringae* ۲۳

۲-۷- بیماری های ناشی از *P. syringae* pv. *syringae* ۲۹

۲-۷-۱- لکه برگی سیرینگایی گوجه فرنگی ۲۹

۲-۷-۲- لکه برگی کدو و طالبی ۳۰

۲-۷-۳- بلایت باکتریایی گندم و جو ۳۰

۲-۷-۴- نکروز جوانه انتهایی و لکه برگی انبه ۳۱

۲-۷-۵- لکه قهوه ای لوبیا ۳۲

۲-۷-۶- نوار قرمز نیشکر ۳۵

۲-۷-۷- شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار ۳۷

فصل سوم: مواد و روش ها ۳۹

۳-۱- نمونه برداری ۴۰

۳-۲- جداسازی و خالص سازی عامل بیماری ۴۰

۳-۳- نگهداری جدایه ها ۴۰

۳-۳-۱- نگهداری جدایه ها در آب مقطر استریل ۴۰

۳-۳-۲- نگهداری جدایه ها روی محیط کشت جامد ۴۱

۳-۳-۳- فریزدرای ۴۱

۳-۴- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه ها ۴۱

۳-۴-۱- لوان ۴۱
۳-۴-۲- اکسیداز ۴۱
۳-۴-۳- آزمایش لهانیدن ورقه های سیب زمینی ۴۲
۳-۴-۴- آزمایش آرجی نین دی هیدرولاز ۴۲
۳-۴-۵- واکنش فوق حساسیت ۴۳
۳-۵- آزمون بیماری زایی ۴۳
۳-۶- الکتروفورز پروتئین ۴۳
۳-۶-۱- استخراج پروتئین ۴۴
۳-۶-۲- تهیه بافرها و محلول های مورد نیاز ۴۴
۳-۶-۲-۱- بافر نمونه ۴۴
۳-۶-۲-۲- بافر ژل جدا کننده ۴۴
۳-۶-۲-۳بافر ژل متراکم کننده ۴۵
۳-۶-۲-۴- بافر الکترود ۴۵
۳-۶-۳- محلول پایه اکریل آمید ۴۵
۳-۶-۴- تهیه ژل اکریل آمید ۴۵
۳-۶-۴-۱- ژل جدا کننده ۱۲ درصد ۴۵
۳-۶-۴-۲- ژل متراکم کننده پنج درصد ۴۶
۳-۶-۵- رنگ آمیزی ژل ۴۶
۳-۶-۶- رنگ بری ژل ۴۶
۳-۷- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۴۶
۳-۷-۱- استخراج DNA ۴۷
۳-۷-۲- سنجش مقدار DNA استخراج شده ۴۷
۳-۷-۳- آغازگرهای استفاده شده در PCR ۴۷
۳-۷-۴- مخلوط واکنش جهت انجام آزمون PCR ۴۸
۳-۷-۵- بافر واکنش 10X ۴۸
۳-۷-۶- بافر TBE 5X ۴۹
۳-۷-۷- برنامه تکثیر آغازگرها ۴۹
۳-۷-۷-۱- برنامه تکثیر آغازگرهای ERIC 1-1R و ERIC 2 ..... ۴۹
۳-۷-۷-۲- برنامه تکثیر آغازگر BOX A-1R ۵۰
۳-۷-۷-۳- برنامه تکثیر آغازگرهای REP 1-1R و REP 2 ..... ۵۰
۳-۷-۷-۴- برنامه تکثیر آغازگر IS50 ..... ۵۰
۳-۷-۸- ITS-RFLP ۵۱

۳-۷-۹- الکتروفورز محصولات PCR ۵۲
۳-۷-۱۰- PCR-RFLP ۵۲
۳-۷-۱۱- آنالیز آماری ۵۳

فصل چهارم: نتایج ۵۴
۴-۱- نمونه برداری و جداسازی ۵۵
۴-۲- ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه ها ۵۸
۴-۳- الگوی پروتئین های سلولی جدایه ها ۶۰
۴-۴- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ERIC-PCR ۶۲
۴-۵- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR ۶۵
۴-۶- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از REP-PCR ۶۸
۴-۷- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از IS50-PCR ۷۱
۴-۸- آنالیز ترکیبی نتایج به دست آمده از مجموعه روش های ERIC-PCR, BOX-PCR و REP-PCR ۷۴
۴-۹- آنالیز ترکیبی نتایج به دست آمده از مجموعه روش های BOX-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR و IS50-PCR ۷۶
۴-۱۰- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از ITS-PCR ۷۸
۴-۱۱- RFLP قطعات ITS تکثیر شده با آنزیم های برشی مختلف: ۷۹
۴-۱۱-۱- برش با آنزیم *Taq*I ۷۹
۴-۱۱-۲- برش با آنزیم *Msp*I ۸۱
۴-۱۱-۳- برش با آنزیم *Hin6*I ۸۳
۴-۱۱-۴- برش با آنزیم *Alu*I ۸۵

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۸۷
بحث ۸۸
پیشنهادات ۹۳
منابع ۹۴

فهرست جداول

جدول۲-۱- خصوصیات بیوشیمیایی گونه *Pseudomonas syringae* Van Hall ۲۰
جدول ۲-۲- خصوصیات برخی از پاتوارهای *P. syringae* ۲۱
جدول ۲-۳- خصوصیات بیوشیمیایی پاتوار *P. syringae* pv. *syringae* ۲۲
جدول ۴-۱- مشخصات جدایه های *P. syringae* pv. *syringae* ۵۶
جدول ۴-۲- نتایج ازمون LOPAT جدایه های *P. syringae* pv. *syringae* جدا شده از نیشکر، درختان میوه هسته دار، گندم و جو، ختمی و لوبیا ۵۹

فهرست اشکال

شکل ۲-۱. علائم بیماری نکروز جوانه انتهایی و لکه برکی انبه ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۳۱
شکل ۲-۲. علائم بیماری لکه قهوه ای لوبیا ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۳۴
شکل۲-۳. علائم بیماری نوار قرمز نیشکر ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۳۶
شکل۲-۴. علائم بیماری شانکر درختان میوه هسته دار ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ۳۸
شکل ۴ -۱. نقوش پروتئین های سلولی جدایه های *Pss* بیماری زا در نیشکر، درختان میوه هسته دار، گندم و جو، ختمی وحبوبات ۶۱
شکل ۴-۲. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* حاصل از ERIC-PCR (ERIC 1R و ERIC2) ۶۳
شکل ۴-۳. ارتباط ژنتیکی میان جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR ۶۴
شکل ۴-۴. الگوی قطعات DNA ژنومی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* حاصل از BOX-PCR (BOX A-1R) ۶۶
شکل ۴-۵. ارتباط ژنتیکی میان جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از BOX A-1R ۶۷

شکل ۴-۶. الگوی اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* حاصل از REP-PCR با آغازگرهای REP 1-1R و REP 2 ..... ۶۹

شکل ۴-۷. ارتباط ژنتیکی میان جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس اثر انگشت ژنتیکی حاصل از REP-PCR با آغازگرهای REP 1-1R و REP 2 ..... ۷۰

شکل ۴-۸. الگوی اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* حاصل از IS50-PCR (IS50) ۷۲

شکل ۴-۹. ارتباط ژنتیکی میان جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس اثر انگشت ژنتیکی حاصل از IS50-PCR (IS50) ۷۳

شکل ۴-۱۰. دندروگرام ارتباط ژنتیکی جدایه های *Pseudomonas syringae pv. syringae* بر اساس الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR، BOX-PCR و REP-PCR ۷۵

شکل ۴-۱۱. دندروگرام ارتباط ژنتیکی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* بر اساس الگوی اثر انگشت ژنتیکی حاصل از ERIC-PCR، BOX-PCR ، REP-PCR و IS50-PCR ۷۷

شکل۴-۱۲. الگوی الکتروفورزی قطعات DNA حاصل از ITS-PCR با آغازگرهای ITS1 و ITS2 . ۷۸

شکل۴-۱۳. الگوی الکتروفورزی قطعات ITS تکثیر شده جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از هضم با آنزیم برشی *Taq*I ۸۰

شکل۴-۱۴. الگوی الکتروفورزی قطعات ITS تکثیر شده جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از هضم با آنزیم برشی *Msp*I ۸۲

شکل۴-۱۵. الگوی الکتروفورزی قطعات ITS تکثیر شده جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از هضم با آنزیم برشی *Hin*6I ۸۴

شکل۴-۱۶. الگوی الکتروفورزی قطعات ITS تکثیر شده جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پس از هضم با آنزیم برشی *Alu*I ۸۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

جنس *Pseudomonas* از خانواده Pseudomonadaceae ، راسته Pseudomonadales، رده GammaProteobacteria، شاخه Proteobacteria و سلسله Bacteria می باشد.

واژه *Pseudomona* به معنای واحد دروغین است که از زبان یونانی pseudo (دروغین) و monas (واحد تکی) مشتق شده است (Anzai *et al.*, 2000). نام *Pseudomonas* برای باکتری های گرم منفی، میله ای شکل و واجد تاژک قطبی در سال ۱۸۹۴ توسط Migula توصیف شد (Palleroni, 1984 & 2005). یکی از گونه های مهم این جنس *Pseudomonas syringae* می باشد که حدوداً دارای ۵۰ پاتوار است. این گونه اولین بار از یاس بنفش (*Syringae vulgaris* L.) توسط M. W. Beijerinck در سال ۱۸۹۹ جدا و در سال ۱۹۰۲ توسط C. J. J. Van Hall تعیین خصوصیت و نامگذاری شد (Hirano & Upper, 2000).

در بررسی های انجام شده بر اساس همولوژی DNA مشخص گردیده است که *P. syringae* یک گونه هتروژن است. ویژگی های فنوتیپی از جمله خصوصیات بیوشیمیایی، الگوی اسیدهای چرب و پروتئین های سلولی برای تشخیص پاتوارهای *P. syringae* مورد استفاده قرار گرفته است (Hirano & Upper, 1990 ; Gonzalez *et al.*, 1999).

یکی از پاتوارهای مهم این گونه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) است که توانایی ایجاد بیماری در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی را دارد (Bradbury, 1986 ; Little *et al.*, 1998). این باکتری در ایران، اولین بار از درختان میوه هسته دار (بهار و همکاران،۱۳۶۱)، گندم و جو (رحیمیان،۱۳۶۸) و نیشکر (Rahimian, 1995) گزارش شده است. بیماریهایی نظیر شانکر درختان میوه هسته دار، بلاست مرکبات، لکه قهوه ای لوبیا، نوار قرمز نیشکر، بلایت برگی گندم و جو، شانکر باکتریایی کیوی، لکه برگی گیاهچه های فلفل، تاولی شدن پوست سیب، بلاست سیب و گلابی، بلایت

و لکه برگی گل رز و یاس توسط جدایه های این باکتری ایجاد مـی شـوند (Hwang *et al.*, 2005 ; Legard *et al.*, 1993).

جدایه های *Pss* یک فیتوتوکسین نکروز کننده به نام سیرینگومایسین (Syringomycin) تولید می کننـد (Zhang & Takemoto, 1987). ژنهـای *syrB* و *syrC* در سـنتز ایـن توکسین و ژن *syrD* در ترشح آن نقش دارند (Zhang *et al.*, 1997). از توالی ژن های *syrB* و *syrC* بـه عنـوان نـشانگرهای هیبریداسیون برای ارزیابی همسانی استرین های *Pss* استفاده شده است (Little *et al.*, 1998).

توانایی *P. syringae* برای آلوده کردن گیاه میزبان وابسته به ژنهای *hrp* است. این ژن ها همچنـین برای القاء واکنش فوق حساسیت (HR) روی گیاه غیر میزبان ضروری هستند (Collmer *et al.*, 2000 ; Galan & Collmer, 1999).

در بسیاری از موارد، جدایه های *P. syringae* که قدرت آلوده سازی میزبان جدیـدی را داشـته و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی مشابه با استرین هـای *P. syringae* pv. *syringae* بـوده اسـت، در ایـن پاتوار جای داده شده است (Little *et al.*, 1998).

ارتباط میان استرین های *P. syringae* pv. *syringae* جدا شده از میزبان هـای مختلـف هنـوز بـه طور دقیق مشخص نمی باشد. تعیین دامنه میزبانی جدایه ها در شرایط طبیعی یا گلخانه اغلب دشوار است (Legard *et al.*, 1993). آزمون های بیوشیمیایی نیز برای تمایز میان استرین های *Pss* کـارایی چنـدانی ندارنـد (Roos & Hattingh, 1987). سیرینگومایسین بـه عنـوان یـک فـاکتور ویـرولانس غیراختصاصی در این استرین ها عمل می کند، در نتیجـه بـرای بررسـی تنـوع درون پاتوارهـای *Pss* مناسب نمی باشد (Zhang *et al.*, 1997).

استفاده از روش های تفکیک کننده سریع، برای تمایز پاتوارهای این گونه و همچنین جلوگیری از انجام آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژی و بیماری زایی، ضروری می باشد (Geysen & Buttreys, 1999).

وجود دو نوع توالی تکراری و کوتاه به نام های Repetitive Extragenic Palindormic(REP) و Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus(ERIC) و نیز BOX و IS های موجود در باکتری های Enteric و طیفی از دیگر باکتری ها به صورت وسیعی در تمایز ژنتیکی باکتری ها مورد استفاده قرار گرفته اند (Chmielewski *et al.*, 2002).

توالی های Insertion (IS) در DNA توالی هایی هستند که قابلیت جابه جا شدن دارند و احتمال حضور آن ها در سراسر ژنوم وجود دارد (Louws *et al.*, 1994).

با انجام PCR با آغازگرهای مربوط به این توالی ها می توان پروفیل ها یا نقوش قابل تمایزی از قطعات DNA تکثیر شده جدایه های مختلف به دست آورد (de Bruijn *et al.*, 1996). درPCR با این آغازگرها امکان مشاهده پلی مورفیسم در سطوح پاتوار و درون پاتوار وجود دارد (Louws *et al.*, 1994).

۱۰۴ استرین *Pss* جدا شده از درختان میوه هسته دار، علف های هرز مجاور باغ های میوه و چند میزبان دیگر، با استفاد از روش های ERIC-PCR و REP-PCR آزمایش شدند و مشخص گردید که استرین های *Pss* جدا شده از درختان میوه هسته دار با استرین های جدا شده از سایر میزبان ها کاملاً متفاوتند (Little *et al.*, 1998).

از روش هایی چون AFLP-PCR, RAPD-PCR نیز می توان برای تفکیک استرین ها استفاده نمود (Clerc *et al.*, 1998).

RFLP نواحی کروموزومی استرین های *P. syringae* توانسته است تفاوت های موجود بین برخی از پاتوارها و درون پاتوارها را مشخص کند (Henson *et al.*, 1992).

با مقایسه نقوش RFLP بخش هایی از ژنوم جدایه های *Pss* جدا شده ازلوبیا، گندم، ذرت و درختان میوه هسته دار مشخص شد که استرین های لوبیا گروه جداگانه ای را در میان این پاتوار تشکیل می دهند (Legard *et al.*, 1993)، لذا تصور می رود، تیپ ویژه یا متمایزی از *Pss* باعث بیماری لکه قهوه ای لوبیا می شود. همچنین بر اساس واکنش غلاف های لوبیا در برابر جدایه های *Pss* مشخص گردیده است که تیپ خاصی از *Pss* عامل بیماری لکه قهوه ای لوبیا می باشد (Cheng *et al.*, 1989).

بررسی شدت بیماری زایی استرین های *Pss* روی برگ های لوبیا نشان داد که شدت بیماری جدایه های به دست آمده از زخم های لکه قهوه ای لوبیا از استرین های جدا شده از میزبان های دیگر بیشتر بود (Saad & Hagedorn, 1972).

نتایج بررسی الگوی پروتئین های سلولی نشان داد که استرین های *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر از این نظر با استرین های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته دار و بلایت باکتریایی گندم و جو متفاوت هستند (Rahimian, 1995 و موسیوند ، ۱۳۸۴). همچنین مشخص گردید که جدایه های *Pss* درختان میوه هسته دار مبتلا به شانکر قادر به ایجاد بیماری روی نیشکر نیستند و جدایه های مولد بیماری نوار قرمز نیشکر فقط شانکرهایی با اندازه بسیار محدود روی درختان میوه هسته دار ایجاد می کنند (Rahimian, 2000 & 2004). نتایج موسیوند و همکاران نشان داد که اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه های *Pss* نیشکر با آغازگرهای ERIC 1R, ERIC 2 و BOX A-1R مشابه بوده و از جدایه های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته دار و بلایت باکتریایی گندم و جو متمایز می باشد (موسیوند و همکاران، ۱۳۸۵). بر اساس این یافته ها احتمال می رود که بیماری نوار قرمز نیشکر توسط استرین خاصی از *Pss* ایجاد شده باشد (Rahimian, 2000).

هدف بررسی حاضر ارزیابی کارایی چند روش مولکولی از جمله REP-PCR، ERIC-PCR، IS50-PCR، BOX-PCR و RFLP-PCR برای متمایز ساختن جدایه های *Pss* عامل بیماری های نوارقرمزنیشکر، لکه قهوه ای حبوبات، بلایت باکتریایی گندم و جو، شانکر درختان میوه هسته دار و لکه زاویه ای ختمی از یکدیگر است.

فصل دوم

بررسی منابع