

ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر
باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در چند استان شمالی ایران*

THE ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF
Pseudomonas syringae pv. *syringae* CAUSING BACTERIAL
CANKER IN STONE FRUITS IN SOME NORTHERN PROVINCES OF
IRAN

واله عباسی**، حشمت‌الله رحیمیان، محمدعلی تاجیک فنبری و وحید رضاییان

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱)

چکیده

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) عامل بیماری‌های بسیاری روی محصولات زراعی و باغی می‌باشد یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ناشی از این باکتری شانکر، لکه برگ و نکروز پوست در درختان میوه هسته‌دار (هلو، شلیل، زردآلو، آلو و گیلاس) است. به منظور بررسی همسانی یا تنوع جدایه‌های عامل بیماری، طی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۸ از باغات درختان میوه هسته‌دار واقع در مناطق مختلف استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی نمونه‌برداری صورت گرفت. باکتری‌های جدا شده از بافت‌های آلوده جوانه، برگ، شاخه و تنه بر اساس آزمون‌های گروه *LOPAT* و *GATTA*، *Pss* شناسایی شدند. تعداد ۷۰ جدایه مورد بررسی‌های فنوتیپی (مورفولوژیکی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی) و الکتروفورز پروتئین‌های سلولی (SDS-PAGE) قرار گرفتند. جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی و الگوی پروتئین‌های سلولی اختلاف‌های جزئی نشان دادند. جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، DNA ژنومی جدایه‌ها استخراج و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (rep-PCR) با استفاده از آغازگرهای *ERIC* و *REP* بررسی شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده نشان داد که در *ERIC-PCR* در سطح تشابه ۷۵ درصد، جدایه‌ها به ۸ گروه و با *REP-PCR* به ۵ گروه و با ترکیب همه آغازگرها به ۹ گروه تقسیم شدند. نتایج نشانگر وجود تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های *Pss* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار بود.

واژه‌های کلیدی: شانکر باکتریایی، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، تنوع ژنتیکی، درختان میوه هسته‌دار

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: valeh_abasi@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و کارشناس گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

شانکر باکتریایی که به وسیله پاتووارهای *Pseudomonas syringae* ایجاد می‌گردد، یکی از مشکلات جدی و محدودکننده در احداث و حفاظت از باغات میوه هسته‌دار می‌باشد (Sulikowska & Sobiczewski 2008). باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* قادر است به درختان هسته‌دار از قبیل هلو، شلیل، آلو، گیلاس، زردآلو و بادام خسارت قابل توجهی در حد ۱۰-۷۵ درصد بزند و عامل بیماری‌های متعددی روی محصولات زراعی و باغی می‌باشد (Agrios 2005). از عمده‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط این پاتوار می‌توان به شانکر باکتریایی درختان زردآلو (Bahar et al. 1985)، شانکر درختان گیلاس (Banapoor et al. 1990)، بلایت گندم و جو (Rahimian 1989) و نوار قرمز نی‌شکر (Rahimian 1994) اشاره کرد.

اعضای متعلق به جنس *Pseudomonas* گرم منفی، میله‌ای یا استوانه‌ای خمیده با ابعاد $۰/۵-۱/۰ \times ۰/۵-۴/۰$ میکرومتر می‌باشد که سلول‌های آن توانایی حرکت به وسیله یک یا چندین تاژک قطبی را دارند و درصد G+C در DNA آنها ۵۸-۷۱ درصد می‌باشد. این باکتری کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و اکثر گونه‌ها بجز استرین‌های *Pseudomonas. syringae. pv. persica* (Schaad et al. 2001) روی محیط KB تولید رنگ فلورسنت می‌کنند (Schaad et al. 2001). یکی از مهم‌ترین دلایل عدم موفقیت در مدیریت بیماری‌های گیاهی، ناقص بودن اطلاعات ما در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت بیمارگرها می‌باشد و بالابردن اطلاعات در این زمینه در اتخاذ روش‌های موثر کنترل و استراتژی کنترل کارآمدتر خواهد بود (Martin & English 1997). در دو دهه اخیر با گسترش استفاده از روش‌های مولکولی، تشخیص و طبقه‌بندی پروکاریوت‌های

بیماری‌زای گیاهی دچار دگرگونی شده است و براساس توالی‌های کاملاً حفظ شده، نیمه حفظ شده و کاملاً متغیر باکتریایی آغازگرهایی طراحی شده‌اند که در تشخیص کاربرد دارند (Hayward 1996). 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 REP، ERIC و BOX با جزئیات بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که با طراحی آغازگرهایی براساس این توالی‌های تکراری متمم‌هایی تحت عنوان REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR (rep-PCR) ارائه شده‌اند که منجر به تکثیر نواحی اختصاصی ژنوم می‌گردد و الگوی ژنومی به دست آمده از این روش‌ها باعث تولید و تمایز قطعاتی با اندازه‌های مختلف DNA ژنوم اختصاصی جدایه می‌گردد که به عنوان بارکد برای هر جدایه خاص بکار می‌رود (Louws et al. 1994).

توالی‌های خارج ژنی پالیندرومی (REP)، توالی‌های تکراری ۳۳ تا ۴۰ نوکلئوتیدی از دو سر متقارن (Palindromic) هستند. این توالی‌ها در حدود ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ بار در ژنوم باکتری تکرار می‌شوند و حدود ۱ درصد از ژنوم باکتری را شامل می‌شوند (Versalovic et al. 1994). توالی‌های تکرارشونده بین‌ژنی انتروباکتریایی (ERIC) دارای ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت نوکلئوتیدی با یک توالی معکوس مرکزی حفظ شده هستند که در نواحی خارج ژنومی، ژنوم باکتری‌ها قرار می‌گیرند. این توالی‌ها اولین بار در ژنوم باکتری‌های فوق‌الذکر و دیگر باکتری‌های گرم منفی کشف گردید که تقریباً ۳۰ تا ۱۵۰ بار در ژنوم باکتری تکرار می‌شود (Versalovic et al. 1994). با توجه به اهمیت *Pss* و امکان اختصاصی بودن دامنه میزبانی در بین جدایه‌های این باکتری، ارزیابی تنوع ژنتیکی

کمی بیشتر با جدایه‌های سوختگی برگ گندم دسته‌بندی می‌شوند. تحقیق حاضر به منظور بررسی چگونگی جمعیت *Pss* عامل شانکر باکتریایی درختان مختلف میوه هسته‌دار در مناطق شمالی کشور از جمله استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی با استفاده از نشانگرهای ERIC و BOX صورت گرفته است. این پژوهش با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار با استفاده از نشانگرهای ERIC و REP صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌ها

بین سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۸ از باغات درختان میوه هسته‌دار واقع در مناطق مختلف استان‌های اردبیل (دشت مغان و مشکین‌شهر)، گیلان (آستارا، تالش و اسالم)، مازندران (ساری و نکا) و خراسان رضوی (نیشابور و سبزوار) نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از بازدید از باغات هلو، شلیل، زردآلو، گیلاس، و آلو، از درختان دارای علائم لکه‌برگی و شانکر باکتریایی، نمونه‌هایی از بافت‌های آلوده، برگ، تنه، شاخه و سرشاخه جمع‌آوری گردید و در داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در دمای ۴°C نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری، ابتدا برگ‌های دارای علائم لکه‌برگی نکروزه و شاخه‌های دارای شانکر در زیر جریان آب معمولی شسته شدند و سپس به مدت ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد قرار گرفتند. سپس با آب مقطر سترون دو بار شستشو شده و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس از حدفاصل بافت سالم و آلوده برگ و حاشیه شانکر روی شاخه قطعات ۲-۱ سانتی‌متری جدا و در تشتک‌های

جمعیت‌های عامل شانکر باکتریایی می‌تواند به ارائه یک طبقه‌بندی استوار و محکم کمک کند و امکان انتخاب جدایه‌ها و استفاده از آنها را در مطالعات آینده فراهم سازد (Versalovic et al. 1994). بررسی‌هایی در زمینه تنوع جمعیت‌های *Pss* عامل چند بیماری از جمله شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، بلاست درختان میوه دانه‌دار، سوختگی (بلایت) برگ غلات، نوار قرمز نیشکر و لکه برگی چغندر قند در ایران صورت گرفته است. *الداغی و همکاران* با استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی، سرولوژیکی و نقوش ایزوزیمی موفق به تفکیک جدایه‌های *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار از جدایه‌های مولد سوختگی برگ غلات شدند (Aldaghi et al. 2009). تفاوت‌های مختصری در نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی در میان جدایه‌های درون هر گروه نیز وجود داشت.

در بررسی نجفی‌پور و تقوی (Najafi Pour & Taghavi 2011) جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار، گل سرخ و یک جدایه از شمعدانی و یک جدایه از گونه‌ای *Malva* را براساس انگشت‌نگاری ژنتیکی با Box-PCR در یک گروه، جدایه‌های به دست آمده از دانه‌داران، یک جدایه شمعدانی، دو جدایه از هلو به همراه یک جدایه استاندارد در گروه دوم و جدایه‌های به دست آمده از غلات همراه با یک جدایه از چغندر و یک جدایه از هلو، در گروه سوم از سه گروه قرار گرفتند. موسیوند و همکاران (Moasivand et al. 2009) در rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC1 و ERIC2، توانستند جدایه‌های شبه *Pss* مولد نوار قرمز نیشکر را از جدایه‌های عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و سوختگی برگ غلات متمایز سازند. در بررسی آنان جدایه‌های عامل لکه برگی ختمی خواب‌آلود (*Malvaviscus sp.*) به جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار نزدیک بوده و در فاصله

از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر روی سطح برگ‌ها پاشیده و روی نهال‌ها با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد. جهت تأمین رطوبت کافی، سرشاخه‌ها با آب پاش خیس شده و پوشش نایلونی روی آنها قرار داده شد. روی نهال‌های شاهد نیز به همان مقدار آب مقطر سترون پاشیده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای 25°C نگهداری شدند (Mohammadi *et al.* 2001, Jones 1971)

آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ایی

آزمون اکسیداز به روش کواکس (Kovacs 1956)، واکنش گرم، فعالیت کاتالاز، تولید لوآن، فعالیت پکتولیتیکی، هیدرولیز ژلاتین، اسکولین، آربوتین، نشاسته و توئین 8° رشد هوازی/بی‌هوازی، تولید اوره‌آز، احیای نیترات، رشد در نمک طعام 5% درصد، تولید رنگدانه فلورسنت، واکنش فوق حساسیت، تولید آرژنین‌دی‌هیدرولاز، رشد در دمای 37°C و آزمون توانایی استفاده از برخی منابع هیدروکربنی به روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) انجام شد.

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی کشت شدند و بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از آنها در 500 میکرولیتر آب مقطر تهیه و چگالی نوری (Optical density, OD) آنها به یک واحد OD در 600 نانومتر با اسپکتروفتومتر تنظیم گردید. به منظور لیز شدن سلول‌ها، به اندازه $1/10$ حجم، سدیم دودسیل سولفات (SDS) 10% درصد به هر سوسپانسیون اضافه شد و به مدت ۴-۵ دقیقه در حمام بن‌ماری (دمای جوش) قرار گرفتند. برای تخریب کامل دیواره سلولی باکتری‌ها، نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه با دستگاه تراسونیک کاملاً همگن شده و در ادامه به مدت 10 دقیقه با سرعت

پتری به وسیله تیغ اسکالپل سترون خرد گردیده و چند قطره آب مقطر سترون به آنها اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه، یک لوپ از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی برداشته و روی محیط کشت آگار غذایی دارای 5% درصد سوکروز (NAS) مخطط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای 27°C نگهداری شد تک پرگنه‌های به رنگ کرم و سفید و محدب انتخاب و مجدداً روی محیط آگار غذایی خالص گردیدند (Rademaker 2000). از باکتری‌های تازه کشت شده (۲۴ ساعته) سوسپانسیون غلیظی در میکروتیوپ‌های حاوی آب مقطر سترون تهیه و در دمای 4°C نگهداری شدند (Sands *et al.* 1970).

آزمون اثبات بیماری‌زایی

آزمون واکنش فوق حساسیت در برگ‌های تونون و شمعدانی براساس روش کلمنت و همکاران (Klement *et al.* 1974) انجام شد. آزمون بیماری‌زایی به روش تزریق سوسپانسیون در بافت گیاهی انجام شد (Thomidis *et al.* 2005). برای این منظور از نهال‌های یکساله هلو (رقم Springtime) و زردآلو (رقم حسین‌خانی) که از مرکز تهیه بذر و نهال مغان تهیه شده بود، استفاده شد. از کشت‌های ۲-۱ روزه جدایه‌های باکتریایی، سوسپانسیونی با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر (براساس کدورت‌سنجی با اسپکتروفتومتر در طول موج 600 نانومتر) تهیه و با استفاده از سرنگ انسولین 10 میکرولیتر از سوسپانسیون به زیر پوست سرشاخه‌های جوان و سالم هلو و زردآلو تزریق گردید.

برای اثبات بیماری‌زایی روی برگ، سرشاخه‌های دارای برگ‌های سالم انتخاب شده و سطح برگ‌ها با پنبه آغشته به اتانول 70% درصد ضدعفونی شدند. آنگاه به وسیله سوزن روی برگ‌ها زخم‌هایی ایجاد و سپس مقدار 50 میکرولیتر

مینی ژل یک درصد آگاروز در ۷۰ ولت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. وجود یک باندها با وزن مولکولی بالا و بدون کشیدگی در طول ژل به عنوان معیار مناسب بودن کیفیت DNA تلقی گردید.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

آغازگرهای REP2-I و REP1-I، ERIC2، ERIC1R (Little & Gilbertson, Lupski & Weinstock 1992) 1997 و 1992 (de Bruijn) ارسالی از شرکت سیناژن، تهران مورد استفاده قرار گرفتند. توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرها با افزودن آب دوبار تقطیر استریل به غلظت ۱۰ پیکومول رقیق و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۲۵ میکرولیتر) شامل ۲۳ میکرولیتر محلول پایه (۵/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای ۱۰ پیکومولار fdw، rev ۵/۵ میکرولیتر dNTPs ۰/۲ میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR(10X)، ۱ میکرولیتر محلول کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، ۰/۳ میکرولیتر محلول پلیمرز تک (Taq Polymerase) با غلظت ۲/۵ واحد در میکرولیتر، ۱۷/۷ میکرولیتر آب مقطر سترون) به علاوه ۲ میکرولیتر از DNA نمونه بود.

برنامه دمایی برای REP-PCR (Zhao et al. 2000) به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۴۰°C و ۸ دقیقه در ۶۵°C و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۶۵°C و برنامه دمایی برای ERIC-PCR (Little et al. 1998) به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۵۰°C و ۲ دقیقه در ۷۰°C و

۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشت لایه رویی، نصف حجم به آن گلیسرین سترون اضافه شد و به عنوان پروتئین باکتری در چاهک‌های ژل مورد استفاده قرار گرفتند. الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌اکریل‌امید با استفاده از سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) با تغییرات مختصری توسط رحیمیان (Rahimian 1994) صورت گرفت. غلظت آکریل‌امید در ژل جداکننده ۱۰ درصد و در ژل متراکم کننده ۵ درصد بود. الکتروفورز در شدت جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر انجام شد، سپس ژل در محلول ۰/۱ درصد کومازی بلو (آب، اسید استیک، متانول به نسبت ۵۰:۱۰:۵۰ و ۰/۱ گرم کومازی بلو) به مدت ۳ ساعت رنگ‌آمیزی و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در همان محلول ولی بدون رنگ کومازی بلو رنگ بری و در اسید استیک ۷ درصد نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لیز قلیایی انجام شد (Arabi et al. 2006). بدین ترتیب جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی کشت شده و بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیون از آنها در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. به منظور لیز شدن سلول‌ها، به اندازه ۰/۱ حجمی KOH ۱۰٪ به هر سوسپانسیون اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه لیز شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس لایه رویی به عنوان DNA از لوله‌ها برداشته و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. برای حصول اطمینان از وجود DNA خالص در نمونه‌های خالص‌سازی شده، ۵ میکرولیتر از DNA فوق همراه با یک میکرولیتر محلول برم فنول بلو در سوکروز روی

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR

Table 1. Name and sequence of primers used in PCR.

Primer آغازگر		Sequence توالی
REP	REP1-I	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'
	REP2-I	5'-ICG ICT TAT CIG GGC TAC-3'
ERIC	ERIC1R	5'-ATG TAAGCT CCT GGG GAT TCA-3'
	ERIC2	5'-AAG TAAGTG ACT GGG GTG AGC-3'

۲/۰۲ (Rohlf 1990) ترسیم گردید. از ضریب تشابه جاکارد برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش داده‌های جفت‌شده غیروزنی (UPGMA)، جهت ترسیم درخت فیلوژنی و آنالیز خوشه‌ای داده‌ها استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده از سه روش مذکور به صورت ترکیبی نیز انجام شد. برای به دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر، کارایی روش‌های مختلف تجزیه کلاستر به کمک ضریب همبستگی کوفتیک (Farris 1969) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارزیابی ضریب کوفتیک میزان ضریب تشابه به دست آمده از طریق ضرایب جاکارد (Jaccard)، دایس (Dice) و سیمپل مچینگ (Simple matching) با استفاده از نرم‌افزار فوق‌الذکر محاسبه و با یکدیگر مقایسه شدند. ضریب کوفتیک بالاتر نشانگر مناسب‌تر بودن روش خوشه‌بندی تلقی گردید (Sokal & Rohlf 1962) و (Sneath & Sokal 1973).

نتایج

جداسازی

در این بررسی ۷۰ جدایه از نمونه‌های آلوده شاخه و برگ درختان میوه هسته‌دار شامل هلو (۳۵ جدایه)، شلیل (۶ جدایه)، زردآلو (۱۴ جدایه)، آلو (۶ جدایه) و گیلاس (۹ جدایه) از مناطق مختلف استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی روی محیط آگار مغذی

یک چرخه انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR در دمای ۴°C نگهداری شدند. از دستگاه ترموسایکلر (Personal termocycler, Eppendorf, Germany)، جهت تکثیر استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR

ژل آگارز ۱/۵ درصد در پس از تهیه سینی الکتروفورز ریخته شد. از بافر TBE(1X) جهت الکتروفورز استفاده شد. پنج میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر مخلوط گردیده و هر نمونه در چاهک‌های جداگانه ریخته شد. و چاهک‌های انتهایی با ۴ میکرولیتر از مارکر DNA نیز بارگذاری شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت الکتروفورز شدند. ژل سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (یک میلی‌گرم در لیتر) رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر، در دستگاه ژل داکيومنت مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

بعد از به دست آمدن انگشت‌نگاری ژنومی ERIC-PCR و REP-PCR براساس وجود و یا عدم وجود باند، نمره‌دهی به صورت کدهای صفر و یک انجام شد و داده‌های به دست آمده به صورت ماتریکس در نرم‌افزار Excel وارد شدند و درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار ان‌تی‌سی‌سیس، نسخه

جدایه‌های مورد بررسی به‌عنوان جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Schaad et al. 2001) شناسایی شدند.

بیماری‌زایی

علائم بیماری بعد از یک هفته از تزریق سوسپانسیون مربوط به ۷۰ جدایه به پشت برگ‌ها، شاخه‌ها و سرشاخه‌های جوان در نهال‌های هلو و زردآلوی مایه‌زنی شده ظاهر گردید. در نهال‌های شاهد که با آب‌مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، علائمی ظاهر نشد. روی برگ‌ها لکه‌های آسوخته مشاهده شد که این لکه‌ها بتدریج از قسمت وسط نکرور شدند. و در روی شاخه‌ها و سرشاخه‌ها نیز بعد از گذشت تقریباً ۹ روز زخم‌های سیاه فرورفته مشاهده شد که در برخی از این زخم‌ها ترشح صمغ نیز دیده شد. جدایه‌های باکتری دوباره از لکه‌ها و شانکرها جداسازی گردیدند (شکل ۱).

الکتروفورز پروتئین

در مقایسه نقوش پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Pss* مناطق مختلف، شباهت‌های بالایی را به یکدیگر و به جدایه استاندارد نشان دادند. نقوش پروتئینی جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف نیز مشابه بود (شکل ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ERIC و REP-PCR

پس از استخراج DNA از جدایه‌ها و نیز غلظت‌سنجی آن با روش‌های الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکترومتر، DNA به‌دست آمده از جدایه‌های مختلف جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفت. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از

جداسازی گردید. مشخصات مربوط به جدایه‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

پرگنه جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی مدور، به رنگ کرم مایل به زرد، لزج و برآمده و روی محیط YDC کرم‌رنگ و غیر لزج بود. حاشیه پرگنه در برخی از جدایه‌ها صاف و در برخی نیز کمی موج‌دار بود. جدایه‌ها بعد از ۴۸ ساعت کشت روی محیط KB تولید رنگدانه فلورسنت کردند. آزمون گرم در همه جدایه‌ها منفی بود. تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون بودند. جدایه‌ها هوازای اجباری بوده و تولید لوان، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین و اسکولین در همه آنها مثبت بود. تولید اکسیداز، اوره آز، آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز کازوئین‌شیر، احیای نیترات، تولید ایندول و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی در همه جدایه‌ها منفی بود.

جدایه‌ها قادر به تولید H_2S از پیتون، گاز از گلوکز و لیسیتیناز و رشد در دماهای بیشتر از $37^{\circ}C$ نبودند. قابلیت هیدرولیز توئین ۸۰ در بین جدایه‌ها متغییر و هیدرولیز نشاسته در همه جدایه‌ها منفی بود. جدایه‌ها توانایی تحمل نمک‌طعام ۵ درصد را داشتند ولی نتوانستند روی محیط نمک‌طعام ۶ درصد نمک‌طعام رشد کنند. جدایه‌ها قادر به تولید اسید از گلوکز، فروکتوز، سوربیتول، مانوز، گالاکتوز، سوکروز، آرابینوز، مالتوز، اینوزیتول، مانیتول، اینوزیتول، گلیسرول، رافینوز و اریتریتول بودند ولی هیچ یک از جدایه‌ها نتوانستند از لاکتوز، تری‌هالوز، رامنوز، سلوبیوز و ادونیتول اسید تولید نمایند. هم‌چنین جدایه‌ها قادر به استفاده از تریپتوفان، ال‌تیروزین، دی‌تارتارات، ال‌تارتارات و ال‌آل‌آل‌آلین نبودند. همه جدایه‌ها قابلیت قلیایی کردن شیر را داشتند. براساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی تمامی

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی

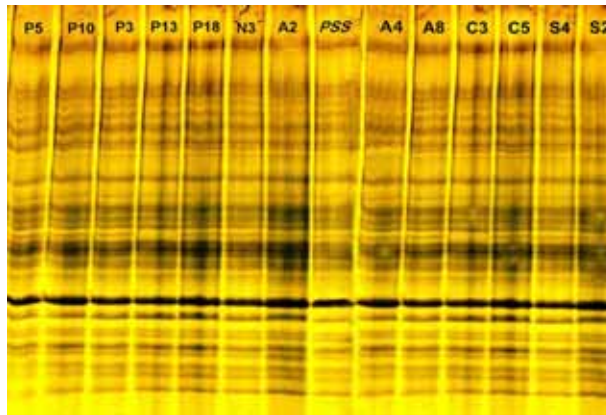
Table 1. List of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates recovered from stone fruit trees in Ardebil, Guilan, Mazandaran and Khorasane-Razavi provinces.

شماره جدایه (Strain)	محل جمع‌آوری (Origine)	میزبان (Host)
P1 تا P10	اردبیل - مشکین شهر (Ardebil-Meshkinshahr)	هلو (Peach)
P11 تا P25	اردبیل - کشت و صنعت مغان (Ardebil-Moghan)	شلیل (Nectarine)
P26 تا P29	مازندران - ساری (Mazandaran-Sari)	زردآلو (Apricot)
P30 تا P32	مازندران - نکا (Mazandaran-Neka)	گیلاس (Sweet cherry)
P33 تا P35	خراسان رضوی - سبزوار (Khorasan-sabzevar)	آلو (Plum)
N1 تا N4	اردبیل - کشت و صنعت مغان (Ardebil-Moghan)	
N5 و N6	مازندران - ساری (Mazandaran-Sari)	
A1 تا A8	اردبیل - مشکین شهر (Ardebil-Meshkinshahr)	
A9 تا A11	خراسان رضوی - سبزوار (Khorasan-sabzevar)	
A12 تا A14	خراسان رضوی - نیشابور (Khorasan-Neishaboor)	
C1 و C3	اردبیل - مشکین شهر (Ardebil-Meshkinshahr)	
C4 تا C6	گیلان - تالش (Guilan-Talesh)	
C7 تا C9	گیلان - آستارا (Guilan-Astara)	
S1 تا S3	گیلان - تالش (Guilan-Talesh)	
S4 و S5	گیلان - اسالم (Guilan-Asalem)	
S6	گیلان - آستارا (Guilan-Astara)	



شکل ۱. نتایج آزمون بیماری‌زایی روی نهال هلو. علائم شانکر روی شاخه همراه با ترشح صمغ (شکل سمت راست)، علائم لکه آفسوخته روی برگ (شکل سمت چپ)

Fig.1. The results of pathogenicity test on peach plant, symptoms of canker on shoot with gum exudation (right), leaf spot symptoms (left).



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر از مناطق مختلف استان‌های اردبیل (P5, P10, P13, P18, N3, A2, A4, A8, C3), گیلان (C5, S4, S2) در ژل پلی‌اکریلامید: Pss جدایه استاندارد (جدایه به‌دست آمده از هلو، کد ۱۴۱-برزیل)

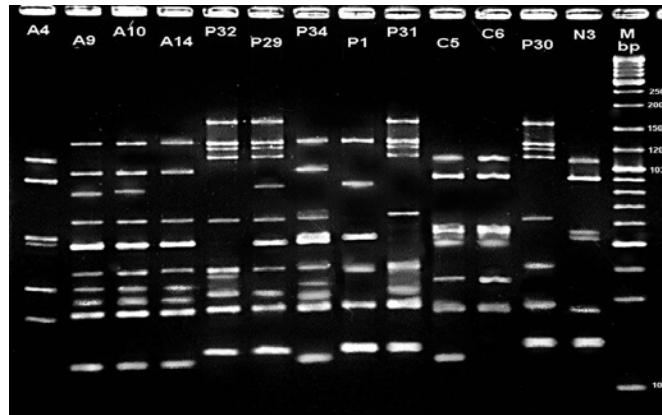
Fig.2. Electrophoretic profiles of cell protein of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from different parts of Ardebil (P5, P10, P13, P18, N3, A2, A4, A8, C3), Guilan (C5, S4, S2) provinces, Pss: standard strain isolated from peach in Brazil, No;141.

بین ۶ تا ۱۲ باندها با اندازه تقریبی ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ bp بود. آنالیز خوشه‌ای نتایج به‌دست آمده با آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 نشان داد که در سطح تشابه ۶۰ درصد، جدایه‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. جدایه‌های به‌دست آمده از استان‌های مازندران و خراسان رضوی به علاوه ۳ جدایه از استان اردبیل و ۲ جدایه از گیلان در یک گروه و بقیه جدایه‌های مربوط به استان‌های اردبیل و گیلان در گروه دیگر قرار گرفتند. در سطح تشابه ۷۵ درصد جدایه‌ها به ۸ گروه قابل تمایز بودند (شکل ۴).

اثر انگشت ژنومی حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های Pss به‌دست آمده از استان‌های مختلف با روش REP-PCR در شکل ۵ نشان داده شده است. تعداد باندهای تکثیر شده بین ۴ تا ۱۵ باندها و محدوده اندازه باندها بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ bp بود. آنالیز خوشه‌ای نتایج به‌دست آمده با آغازگرهای REP1R و REP2 نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه با ۶۲ درصد تشابه در دو گروه قرار می‌گیرند که یک گروه شامل تمامی جدایه‌های به‌دست آمده از

دو روش ERIC و REP-PCR مربوط به جدایه‌های مختلف به‌دست آمد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های به‌دست آمده، به روش UPGMA انجام شد. ضریب همبستگی کوفتیک میزان تشابه به‌دست آمده از طریق ضرایب جاکارد، دایس و سیمپل مچینگ برای آغازگر ERIC به ترتیب ۰/۹۱، ۰/۸۸، ۰/۸۷ و برای آغازگر REP به ترتیب ۰/۸۹، ۰/۸۷، ۰/۸۶ بود. با توجه به اینکه ضریب جاکارد نسبت به دو ضریب دیگر از ضریب همبستگی کوفتیک بالاتری برخوردار بود بنابراین برای خوشه‌بندی بهتر و تعیین میزان تشابه بین جدایه‌ها، از این روش استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل از هر دو روش مذکور به صورت ترکیبی نیز انجام شد و دندروگرام به‌دست آمده از ترکیب داده‌های حاصل از REP و ERIC-PCR ترسیم گردید و ضریب کوفتیک آن ۰/۹۳ محاسبه شد.

DNA ژنومی هریک از جدایه‌های Pss به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار با روش ERIC-PCR تکثیر گردید (شکل ۳). تعداد باندهای تکثیر شده با این روش



شکل ۳. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار استان‌های اردبیل (A1, P1, N3)، گیلان (C6, C5)، مازندران (P32, P29, P31, P30) و خراسان رضوی (A9, A10, A14, A14, P34) حاصل از ERIC-PCR با آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 در ژل آگارز ۱/۵ درصد (نام جدایه‌ها همراه با 100 bp (M) Plus DNA-Ladder (از شرکت Fermentas) در بالای شکل گنجانده شده است)

Fig. 3. Genomic fingerprints of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates generated from ERIC-PCR with primers ERIC1R & ERIC2 in 1.5% agarose gel. Isolates recovered from Ardebil (A1, P1, N3), Gilan (C5, C6), Mazandaran (P32, P29, P31, P30) and Khorasan-e-Razavi (A9, A10, A14, P34). M: Marker(100-bp ladder, Fermentas).

گروه تقسیم شدند. در سطح تشابه ۷۵ درصد جدایه‌ها به ۹ گروه قابل تمایز بودند.

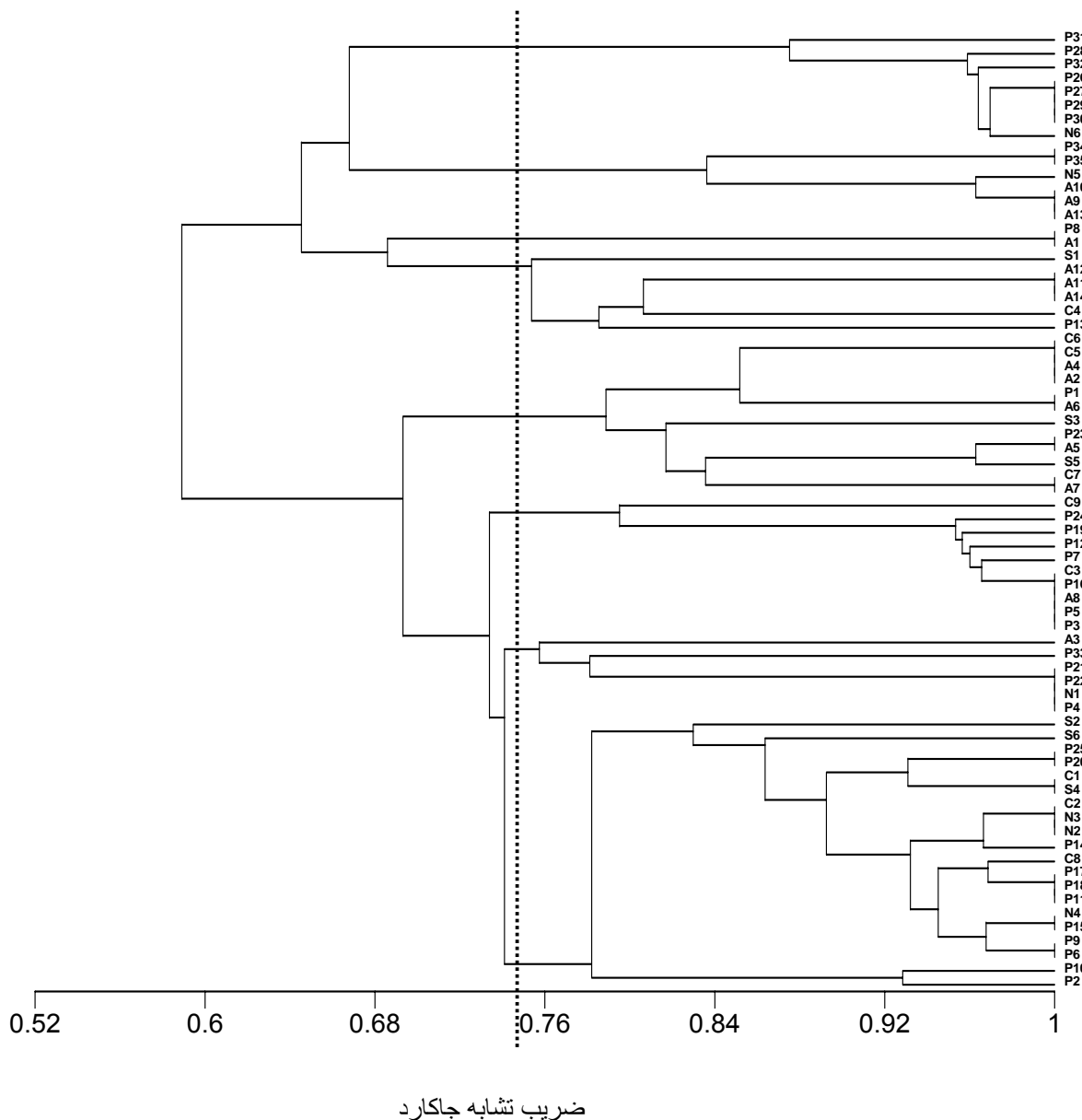
بحث

خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های مورد مطالعه با خصوصیات پاتووار *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* داشت (Palleroni 1984). بنابراین همه جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق به عنوان *Pss* شناسایی شدند. رحیمیان (Rahimian et al. 2004) شانکر باکتریایی ناشی از *Pss* را یک بیماری مهم با گسترش وسیع روی درختان هلو و شلیل در مناطق مازندران و گرگان عنوان نموده است. نتایج به دست آمده نشان داد که واکنش تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مشابه یکدیگر بودند. مطالعات محققین قبلی نیز حاکی از تشابه زیاد بین

مناطق مختلف استان‌های مازندران و خراسان رضوی به علاوه ۳ جدایه از استان اردبیل و ۳ جدایه از استان گیلان بود. بقیه جدایه‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۶). در سطح تشابه ۷۵ درصد نیز، جدایه‌ها به ۵ گروه قابل تمایز بودند.

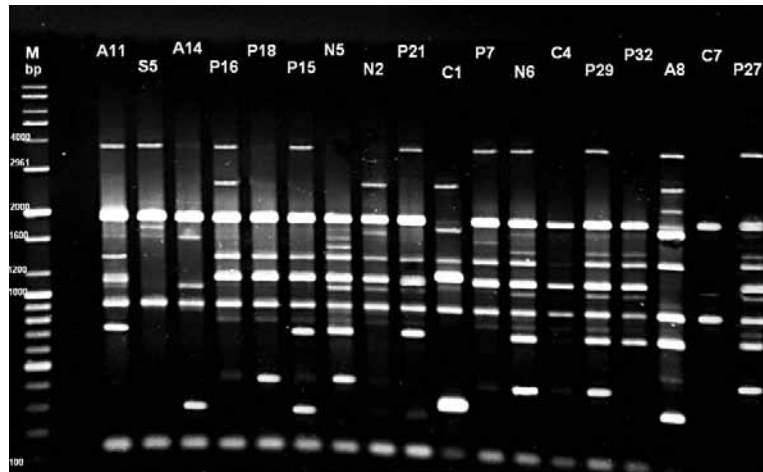
آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از دو روش ERIC و REP-PCR

نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از چهار آغازگر ERIC1R, ERIC2, REP1R و REP2 به صورت مرکب نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه، با ۶۵ درصد تشابه در دو گروه قرار می‌گیرند که گروه اول شامل تمامی جدایه‌های به دست آمده از مازندران و خراسان رضوی به اضافه ۳ جدایه از گیلان و یک جدایه از اردبیل بود و بقیه جدایه‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۷). هر دو گروه در سطح تشابه ۶۵ درصد به دو



شکل ۴. دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان ۷۰ جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار از استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی براساس نقوش قطعات حاصل از ERIC-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است. (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل گنجانده شده است، A: جدایه‌های زردآلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ P: جدایه‌های هلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ N: جدایه‌های شلیل اردبیل و مازندران؛ C: جدایه‌های گیلاس اردبیل و گیلان؛ S: جدایه‌های آلوی گیلان)

Fig. 4. Dendrogram of genetic relatedness of the ERIC-PCR fingerprint patterns generated by 70 strains of *P. syringae* pv. *syringae* recovered stone fruit trees of Ardebil, Guilan, Mazandaran and Khorasane-Razavi. Cluster analysis was performed by using the Jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm. A: apricot isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasan-e-Razavi, P: peach isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasane-Razavi, N: nectarine isolates of Ardebil & Mazandaran, C: sweet cherry of Ardebil & Guilan, S: plum isolates of Guilan.



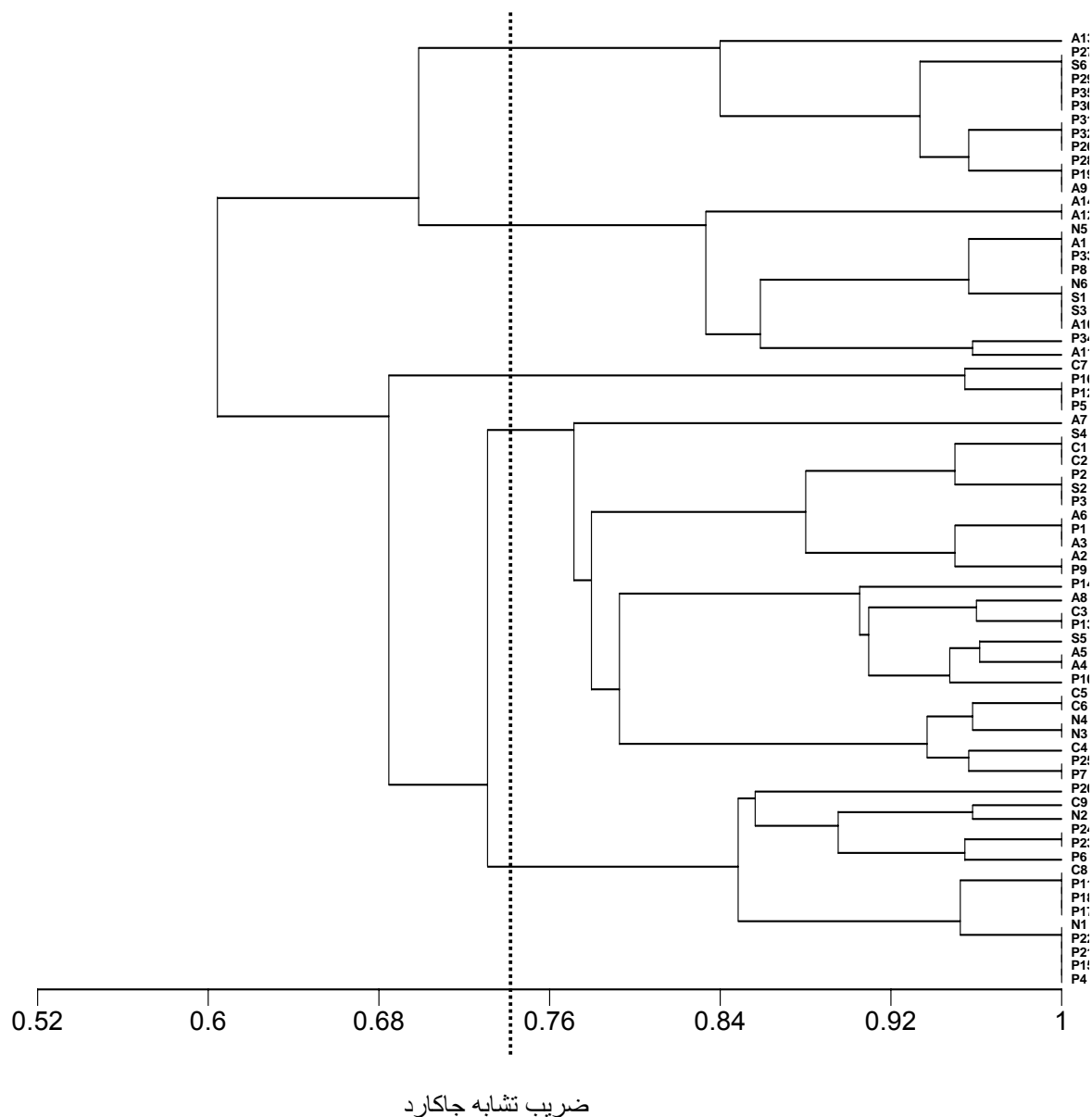
شکل ۵. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از REP-PCR جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از استان‌های اردبیل (P16, P18, P15, N2, P21, C1, P7, A8)، گیلان (S5, C4, C7)، مازندران (N5, N6, P29, P32)، خراسان رضوی (A11, A14) با آغازگرهای REP1R و REP2 در ژل آگارز ۱/۵ درصد (نام جدایه‌ها همراه با M؛ استاندارد جرم مولکولی (100bp DNA-Ladder از شرکت Fermentase) در بالای شکل گنجانده شده است)

Fig. 5. Genomic fingerprints of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates generated from REP-PCR with primers REP1R & REP2 in 1.5% agarose gel. Isolates recovered from Ardebil (P16, P18, P15, N2, P21, C1, P7, A8), Gilan (S5, C4, C7), Mazandaran (N5, N6, P29, P32) and Khorasan-e- Razavi (A11, A14). M: Marker, (100-bp ladder, Fermentas).

روش‌های مبتنی بر PCR نیاز به وقت کمتری دارند و ثبات و کارایی آنها بیشتر است و برای تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های میکروبی واقع در یک گروه بسیار مفید هستند.

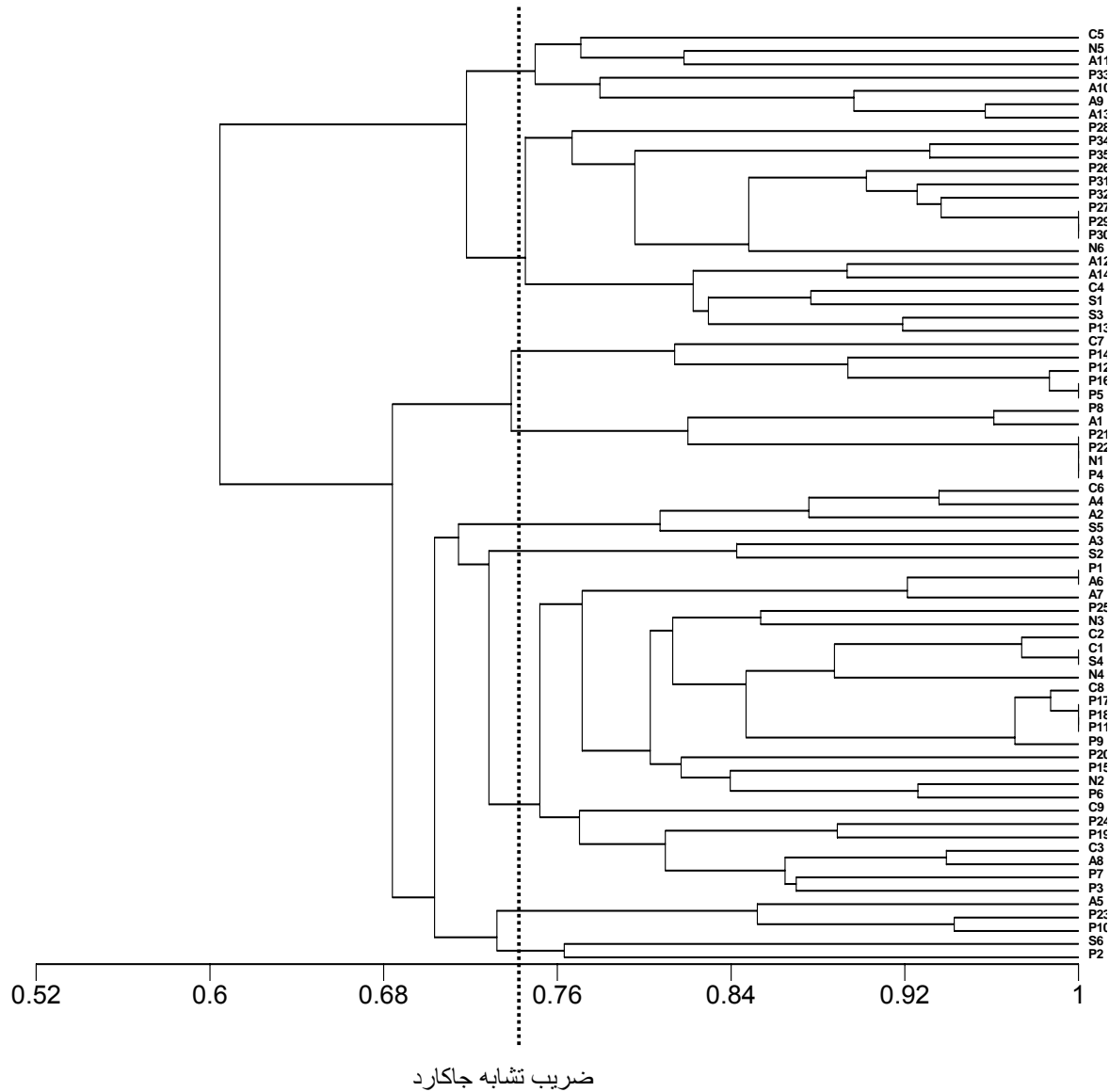
در این بررسی پس از انجام PCR با روش‌های ERIC و REP-PCR اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها به‌دست آمد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل از روش‌های فوق با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد نشان داد که جدایه‌های *Pss* به دست آمده از مناطق مختلف استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی دارای تنوع ژنتیکی هستند. همچنین دندروگرام حاصل از نتایج ERIC و REP-PCR نشان داد که جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و خراسان رضوی در گروه جداگانه‌ای از جدایه‌های مربوط به استان‌های اردبیل و گیلان قرار گرفتند. در این بررسی

جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ خصوصیات فنوتیپی می‌باشد (Aldaghi et al. 2009). در بین جدایه‌ها از لحاظ الگوی پروتئینی تفاوت جزئی و فقط در چند باند سبک وجود داشت. با این وجود الگوی پروتئین‌های سلولی تعداد زیادی از جدایه‌ها بسیار مشابه بود. شباهت الگوی پروتئینی جدایه‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار در بررسی‌های قبلی نیز گزارش شده است (Banapoor et al. 1990, Aldaghi et al. 2000, 2009). به نظر می‌رسد روش مذکور کارایی مناسبی در تمایز جدایه‌های مختلف *Pss* عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار نداشته باشد. بنابراین نیاز به ارزیابی و معرفی روش‌های تشخیص به منظور گروه‌بندی دقیق باکتری‌های بیمارگر گیاهی براساس رهیافت‌های مبتنی بر اثر انگشت ژنتیکی وجود دارد (Louws et al. 1999). دی برئین و همکاران (de Bruijn et al. 1996) نشان دادند که



شکل ۶. دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار مبتلا به شانکر باکتریایی از استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی براساس نقش قطعات حاصل از REP-PCR در ژل آگارز، تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است. (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل گنجانده شده است، A: جدایه‌های زردآلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ P: جدایه‌های هلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ N: جدایه‌های شلیل اردبیل و مازندران؛ C: جدایه‌های گیلاس اردبیل و گیلان؛ S: جدایه‌های آلوی گیلان)

Fig. 6. Dendrogram of genetic relatedness of the REP-PCR fingerprint patterns generated by 70 strains of *P. syringae* pv. *syringae* recovered stone fruit trees of Ardebil, Guilan, Mazandaran and Khorasane-Razavi. Cluster analysis was performed by using the Jaccard similarity coefficient and The UPGMA algorithm. A: apricot isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasan Rzavi, P: peach isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasan-e-Razavi, N: nectarine isolates of Ardebil & Mazandaran, C: sweet cherry of Ardebil & Guilan, S: plum isolates of Guilan.



شکل ۷. دندروگرام مربوط به ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار مبتلا به شانکر باکتریایی از استان‌های اردبیل، گیلان، مازندران و خراسان رضوی براساس نقش قطعات حاصل از ERIC و REP-PCR در ژل آگارز. تشابه جدایه‌ها براساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است. (کد جدایه‌ها در سمت راست شکل گنجانده شده است، A: جدایه‌های زردآلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ P: جدایه‌های هلوی اردبیل، مازندران و خراسان رضوی؛ N: جدایه‌های شلیل اردبیل و مازندران؛ C: جدایه‌های گیلاس اردبیل و گیلان؛ S: جدایه‌های آلوی گیلان)

Fig. 7. Dendrogram of genetic relatedness of 70 strains of *P. syringae* pv. *syringae* recovered stone fruit trees of Ardebil, Guilan, Mazandaran and Khorasane-Razavi. The similarity is the result of the combined data set of ERIC and REP-PCR using UPGMA analysis and Jaccard's coefficient. A: apricot isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasan-e-Razavi, P: peach isolates of Ardebil, Mazandaran & Khorasane-Razavi, N: nectarine isolates of Ardebil & Mazandaran, C: sweet cherry of Ardebil & Guilan, S: plum isolates of Guilan.

در بررسی‌های نجفی پور و تقوی روی ۵۸ جدایه *Pss* به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف از جمله درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار، گیاهان زینتی (گل سرخ و شمعدانی)، چند گونه از غلات و گونه‌های دولپه‌ای، مشخص گردید که جدایه‌های *Pss* براساس انگشت‌نگاری ژنتیکی با *Box-PCR* در سه گروه مختلف قرار می‌گیرند (Najafi Pour & Taghavi 2011). گروه یک آنها شامل اکثر جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار بود که علی‌رغم قرار گرفتن در یک گروه تفاوت‌هایی را داشته و کاملاً یکسان نبودند. در بین آنها جدایه‌هایی از *Malva sp.* شمعدانی و گل سرخ نیز وجود داشت. جدایه‌های به‌دست آمده از درختان میوه دانه‌دار به همراه تعداد کمی از جدایه‌های دیگر از جمله معدودی از درختان میوه هسته‌دار و جدایه استاندارد پاتوار *Pss* در گروه دیگر و جدایه‌های به‌دست آمده از غلات و تعداد کمی جدایه دیگر (از جمله جدایه‌ای از هلو و چغندر) در گروه سوم جای گرفتند. در دندروگرام ترسیمی تنوع بین جدایه‌های هر گروه نیز وجود داشت، هرچند تأکید عمده روی سه گروه اصلی، درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار و غلات بود (Najafi Pour & Taghavi 2011).

در مطالعات انجام شده توسط الداغی و همکاران (Aldaghi et al. 2009) تفاوت‌های سرولوژیکی متمایزکننده جدایه‌های مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار از جدایه‌های ایجادکننده بلایت غلات بوده و نتایج بدست آمده از مقایسه ایزوزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و استراز نیز قابلیت تفکیک این دو گروه جدایه را داشتند. ولی تفاوت قابل توجهی میان جدایه‌های دو گروه مشهود نبود. نتایج مطالعات انجام شده می‌تواند نشانگر این باشد که جدایه‌های مختلف *Pss* به صورت ژنتیکی با یک میزبان خاص سازگار شده‌اند (Najafipour et al. 2011) و

مشخص شد که اثر انگشت ژنتیکی *DNA* ژنومی جدایه‌ها با روش *rep-PCR* می‌تواند به عنوان روشی کارا و مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف *Pss* درختان میوه هسته‌دار و حتی سایر میزبان‌ها مورد استفاده قرار گیرد. کارایی روش *rep-PCR* در متمایز ساختن جدایه‌های مختلف *Pss* از لحاظ ژنتیکی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Mosivand et al. 2009). مقایسه الگوی اثر انگشت ژنتیکی *DNA* ژنومی جدایه‌های *Pss* درختان میوه هسته‌دار با هر سه آغازگر نشان داد که جدایه‌های *Pss* هسته‌داران در استان‌های مذکور متنوع می‌باشند. وجود تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های مختلف *Pss* درختان میوه هسته‌دار با جدایه‌های به‌دست آمده از سایر میزبان‌ها در بررسی‌های قبلی نیز گزارش شده است (Aldaghi et al. 2002, 2009, Mosivand et al. 2009, Najafipour and Taghavi 2011).

یکی از دلایل تنوع بالا بین جدایه‌های *Pss* به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار احتمالاً به دلیل سابقه طولانی کشت این درختان در استان‌های یاد شده می‌باشد بطوریکه احتمالاً میکروفلور همراه، با گذشت زمان با میزبان‌های مختلف سازگار شده‌اند. دندروگرام ترسیم شده براساس ترکیب داده‌های حاصل از *ERIC* و *REP-PCR* بهتر از دندروگرام‌های مربوط به هریک از آنها به تنهایی، ارزیابی شد. به طوری که ضریب کوفتیک *REP* و *ERIC* به ترتیب ۰/۸۹، ۰/۹۱ و ترکیب این سه آغازگر برابر ۰/۹۳ بود. رادمارکر و همکاران (Rademarker et al. 2000) نیز پیشنهاد کردند که برای یک خوشه‌بندی با ثبات، بهتر است داده‌ها با هم ترکیب شوند. موسیوند و همکاران نیز برای به‌دست آوردن یک خوشه‌بندی بهتر از آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از آغازگرها استفاده کردند (Mosivand et al. 2009).

جدایه‌های مختلف پاتووار *Pss*، حتی جدایه‌هایی را که ارتباط ژنتیکی نزدیکی با هم دارند، از یکدیگر متمایز نماید (De Bruijn 1992, Lilley et al. 1996) نتایج به‌دست آمده از ارزیابی تنوع می‌تواند در استراتژی مدیریت بیماری و مطالعات اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی قابل استفاده باشد (Louws et al. 1999).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (133-135) متن انگلیسی مراجعه شود.

تنوع در میان جدایه‌های مختلف این پاتووار به دلیل گسترده بودن دامنه میزبانی آن به مراتب بیشتر از سایر پاتووارهای گونه *Pseudomonas syringae* می‌باشد (Roos & Hattingh 1987). نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های *Pss* مورد مطالعه، دارای خصوصیات فنوتیپی مشابهی بودند لذا این خصوصیات نتوانست تنوع جدایه‌ها را به خوبی نشان دهد قبلاً نیز چنین نتیجه‌ای به‌دست آمده بوده است (Hirano & Upper 2000). با توجه به اینکه روش rep-PCR نتوانست تنوع جدایه‌های مختلف *Pss* را منعکس کند این روش به عنوان یک روش مولکولی سریع و مفید می‌تواند