

شناسایی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv *syringae* جدا شده از درختان میوه هسته دار با استفاده از انگشت نگاری ژنتیکی با توالی REP

ساغر کتابچی*

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی شیراز

دکتر نادر حسن زاده

گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

چکیده

در این تحقیق نقوش ژنومی rep-PCR مربوط به ۲۴ جدایه *P. syringae* pv. *syringae* که از نواحی مختلف ایران و از روی میزبان های مختلف جداسازی شده بودند در مقایسه با استرین استاندارد از کشور یونان مورد ارزیابی قرار گرفتند. DNA باکتری های مورد مطالعه به سه روش فریز-جوشاندن، استفاده از کلنی های خالص و از طریق شستشوی برگ حاوی باکتری تهیه شد. نتایج بدست آمده نشان داد در روش فوق نیاز به استخراج DNA نیست. به علاوه بررسی انگشت نگاری REP نشان داد خصوصیات میزبان و محل زندگی آنها بر روی ژنوم باکتری تاثیر متقابل دارند. به طوری که جدایه هایی که از درختان میوه هسته دار جدا شده بودند مجموعه ای بزرگ و مستقل از جدایه های گندم و نیشکر را تشکیل می دادند. همچنین جدایه های درختان میوه هسته دار که مربوط به یک منطقه جغرافیایی بودند از شباهت های بیشتری بر خوردار بودند. استفاده از توالی REP در روش rep-PCR به عنوان یک روش ساده، دقیق و سریع در جهت شناسایی و طبقه بندی ایزوله های پاتوارهای *P. syringae* مورد مطالعه و تائید قرار گرفت.

واژه های کلیدی: rep-PCR، *Pseudomonas syringae*، درختان میوه هسته دار

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

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۲۲، تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۸

مقدمه

تشخیص و شناسائی دقیق گونه‌ها و پاتوارهای بیمارگرهای مهم باکتریائی چون *Pseudomonas syringae* و *Xanthomonas campestris* چندان آسان نمی باشد (Dye et al., 1980; Young et al., 1992). زیرا صفات مبتنی بر متابولیسم سلولی و بیماریزائی از کارائی لازم برای مطالعات دقیق تر برخوردار نمی باشند (Palleroni, 1984; Vanzyl et al., 1990).

P. syringae pv. *syringae* یکی از پاتوارهای مهم *P. syringae* می باشد که قادر است در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی از جنس های متفاوت ایجاد بیماری کند (Bradbury, 1986). معمولاً در گذشته از آزمون های بیوشیمیائی و نیز علائم ایجاد شده بر روی گیاه میزبان در جهت تشخیص استرین های *P. syringae* pv. *syringae* استفاده می شد که در بسیاری از موارد *P. syringae* با استفاده از این مشخصات تحت نام *pv. syringae* شناسائی می شد که ارتباط میزبانی با دیگر استرین های *P. syringae* pv. *syringae* ندارد (Cheng et al., 1989; Gross et al., 1987). به علاوه روش های بیوشیمیائی ارتباط بین پاتوارهای *P. syringae* pv. *syringae* که روی درختان هسته دار و گیاهان زراعی ایجاد بیماری می کنند را مشخص نمی کند (Gross et al., 1982). بنابراین اتکا به نتایج آزمون های فوق برای نشان دادن تفاوت های تعیین کننده در سطح پاتوار چندان اطمینان بخش نیستند (Hildebrana et al., 1982). ضمن آنکه آزمون های بیماریزائی هم که در شرایط گلخانه انجام می گیرد در مقایسه با شرایط طبیعی آلودگی گیاه میزبان دارای تفاوت هایی بوده و بنابراین به تمهیدات بیشتری نیاز است (Cheng et al., 1989; Ross et al., 1987; Young, 1991).

سایر روش های شناسائی نظیر آزمون های سرولوژیکی (Bendict et al., 1990) آنالیز اسیدهای چرب (Stead et al., 1992)، آنالیز DNA پلاسمیدی (Berthier et al., 1993)؛ آنالیز DNA پلاسمیدی (Denny et al., 1988; Gilbertson et al., 1989) و نقوش پروتئین (Vauterin et al., 1990)؛ آنالیز مولکولی ژنوم باکتری ها این قابلیت را دارد که تفاوت های زیر گونه ای را به خوبی مشخص نماید. یکی از این روش ها انگشت نگاری اختصاصی با استفاده از روش rep-PCR می باشد که از توالی REP¹ به عنوان آغازگر استفاده می شود. این توالی ها نواحی کوچک تکراری در DNA می باشند که به صورت دست نخورده در تمام ژنوم گونه های مختلف باکتریائی وجود دارند (Versalovic et al., 1991). با طراحی آغازگر از روی این توالی و آزمون

¹ Repetitive Extragenic Palendromic

PCR می توان جدایه ها را به طور اختصاصی انگشت نگاری نمود و تفاوت جدایه ها را در حد گونه و زیر گونه مشخص نمود (Cheng *et al.*, 1989; Lows *et al.*, 1994).

در این تحقیق ایزوله های *P. syringae* pv. *syringae* به دست آمده از روی درختان میوه هسته دار و دو جدایه از گیاهان زراعی به روش rep-PCR با استفاده از آغازگر REP مورد مقایسه قرار گرفتند و پلی مورفیسم استرین ها مورد بررسی قرار گرفت. DNA به کار رفته در این آزمون به روش های متفاوت تهیه و نتایج با یکدیگر مقایسه شدند. بررسی های حاضر بر توانائی انگشت نگاری rep-PCR به عنوان یک ابزار تشخیصی دقیق تاکید دارد.

مواد و روش ها

جدایه های باکتریائی بکار رفته

تعداد ۲۵ جدایه از *P. syringae* pv. *syringae* جدا شده از مناطق مختلف ایران بر اساس نوع میزبان به ترتیب جدول یک انتخاب و در مطالعات تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۲۲ جدایه مربوط به درختان میوه هسته دار و گردو، ۲ جدایه از روی میزبان های گندم و نیشکر و جدایه استاندارد *P. s. pv. syringae* با کد BPIC ۲۴۲ از کلکسیون^۱ BPIC کشور یونان مورد استفاده قرار گرفت.

روش های مختلف تهیه DNA/الگو برای مطالعه rep-PCR

جهت بررسی امکان استفاده از DNA الگو بدون نیاز به استخراج DNA خالص، DNA باکتری *P. syringae* pv. *syringae* به روش های زیر تهیه و با یکدیگر مقایسه شدند:

- ۱- استفاده از روش یخ زدن - متعاقباً توضیح داده خواهد شد.
- ۲- مستقیماً از کلنی خالص باکتری که قطر آن حدود ۲-۱ میلی متر بود به مقدار کم، با خلال دندان استریل برداشته و به آرامی به واکنش PCR اضافه گردید (Schadd *et al.*, 2001).
- ۳- استفاده از برگ حاوی باکتری: شاخه ای از درخت بادام حاوی برگهائی با سن ۴ ماه تهیه و سریعاً در گلدان حاوی آب قرار داده شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری مورد نظر تهیه و به سطح برگها اسپری شد. شاخه تیمار با یک کیسه پلاستیکی پوشانیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس یک برگ از آن را جدا کرده و در ۱۰ ml آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه خیسانده شد. در آخر ۱/۵ µl از سوسپانسیون مذکور به مخلوط PCR اضافه گردید (Louws *et al.*, 1994). از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

تهیه و استخراج DNA/الگو به روش یخ زدن - جوشاندن

سوسپانسیون باکتری با جمعیت تقریبی 10^8 CFU/ml ($OD_{600} = 1$) را به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و ۱/۵ µl از سوسپانسیون به دست آمده به واکنش PCR اضافه گردید. سپس باکتری

¹ Benaki Phytopathological Institute Collection

در محیط حاوی ۱۰۰ TritonX-۱، ۲۰ Tween ۲۰، ۰/۵٪ EDTA ۱mM و (pH ۸) mM Tris ۱۰ تهیه شد. سوسپانسیون مذکور به مدت ۳ دقیقه در شرایط فریزر در دمای °C -۷۰ قرار داده شد. سپس به مدت ۳ دقیقه در مخزن آب جوش گذاشته شد. لوله های حاوی سوسپانسیون باکتری در ۱۰۰۰۰ ×g (دور در دقیقه) به مدت ۱۵ دقیقه جهت رسوب سلول های باکتریائی سانتریفوژ شدند. مایع رویی^۱ حاوی DNA آزاد شده از سلول باکتری به لوله های جدید سترون منتقل و در °C ۴ نگهداری شد (Schadd *et al.*, 2001).

آغازگر مورد استفاده برای PCR

انتخاب جفت آغازگر بکار رفته در آزمون rep-PCR مطابق با روش لوز و همکاران بود (Schadd *et al.*, 2001).

آغازگرها منتخب دارای توالی های زیر بود:

5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' REP IR-I -۱

5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' REP2-I -۲

آغازگر فوق توسط شرکت MWG Olige Synthesis, Germany ساخته شد.

مخلوط اصلی PCR شامل ۵۰ pmol از هر پرایمر، ۱/۲۵ mM اکسی نوکلئوتید تری فسفات (Fermentase، سیناژن تهران، ایران)، ۱۰٪ دی متیل سولفوکسید، ۴μg BSA (Boehringer Mannheim Indianapolis, Ind) ۱۶/۶ mM سولفات آمونیوم، ۳۰mM EDTA ۶/۷ mM، ۶/۷ mM کلرید منیزیم، ۶۷ mM Tris-HCL (pH ۸/۸)، ۲U Taq polymerase (سیناژن، تهران، ایران)، ۲۵ μl /۲۰ از Tween ۲۰، ۱٪ به ازاء هر واکنش PCR و آب دیونیزه ۱۲/۵۶ μl به ازاء هر واکنش PCR می باشد. از مخلوط پایه به ازاء هر واکنش PCR، ۲۴ μl برداشته شد و به آن مقدار ۱/۵ μl DNA الگو اضافه شد (Little *et al.*, 1994; Schadd *et al.*, 2001).

سپس روی مخلوط با یک قطره روغن سیلیکون (سیناژن، تهران، ایران) پوشانده شد. لوله های واکنش در DNA ترمال سایکلر^۳ (Eppendorf master cycler gradient) قرار داده شد و دستگاه مطابق برنامه زیر تنظیم گردید

یک سیکل در دمای °C ۹۵ به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ سیکل در دماهای °C ۹۴ برای ۳ ثانیه، °C ۹۲ به مدت ۳۰ ثانیه و برای مرحله اتصال^۴ دمای °C ۴۰ به مدت یک دقیقه، مرحله بسط^۵ دمای °C ۶۵ به مدت ۸ دقیقه و بسط نهائی^۶ °C ۶۵ به مدت ۸ دقیقه و نمونه ها در دمای °C ۴ نگهداری شدند.

¹ Supernatant

² I= all of nucleotide can be use

³ Thermal cycler

⁴ Annealing

⁵ Extention

⁶ Final extention

برای مشاهده محصول PCR، مقدار ۸µl از هر واکنش PCR به چاهک های ژل الکتروفورز اضافه شد. ژل الکتروفورز از آگارز ۱/۵٪ و بافر ۱X TAE تهیه شده بود. (بافر ۱X TAE در هر لیتر شامل ۴/۸ gr Tris-base، ۱۱/۴۲ M Glacial acetic acid و ۳/۷۲ gr Na₂ EDTA بود). برای هر نمونه ۲ µl از ۶X Loading (Fermentas) اضافه شد و برای تعیین اندازه محصول از 1 kb ladder (Fermentas) به عنوان مارکر^۱ و آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز نمونه ها به مدت ۳/۵ ساعت در دمای آزمایشگاه با ولتاژ ۹۸ ولت ادامه یافت. به منظور رنگ آمیزی ژل و مشاهده باندها از اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۰۶ µl/ml استفاده شد و عکسبرداری از ژل ها زیر اشعه UV (طول موج ۳۶۰ nm) انجام گرفت.

آنالیز داده ها

به تمامی باندهایی که در آزمون rep-PCR برای هر جدایه بدست آمد عدد صفر برای نبود هر باند و عدد ۱ برای وجود هر باند نسبت داده شد. با استفاده از تجزیه گر خوشه^۲ Hierarchica وبا استفاده از روش Ward دندروگرام مربوطه رسم گردید (Sokal et al., 1963).

نتایج

بررسی و مقایسه انگشت نگاری Rep استرین های *P. syringae* pv. *syringae* جدا شده از ژنوتیپ های بادام منطقه زرقان فارس و دو جدایه بادام منطقه مهارلو فارس نشان داد جدایه های بادام منطقه زرقان بسیار شبیه به ایزوله های منطقه مهارلو می باشند و پلی مورفیسم آنها به دلیل تفاوت در دو باند می باشد (شکل ۱). از طرفی جدایه های ۱k (ردیف ۲) و ۱۲k و ۲۶k (ردیف ۸ و ۹) مربوط به درختان بادام منطقه زرقان در یک باند با جدایه استاندارد (استرین BPIC 242) متفاوت بود.

مقایسه جدایه هائی که از درختان میوه هسته دار و گیاهان زراعی مناطق مختلف ایران جدا شده بودند نشان داد جدایه های درختان میوه هسته دار دارای شباهت های زیاد با اندک پلی مورفیسم در الگوی باندها (۲-۱ باند) می باشند (شکل ۲). با وجود این جدایه های گندم و نیشکر، بیشترین پلی مورفیسم را داشتند. نتایج تحقیق نشان داد که تعدادی از باندها با جدایه های درختان میوه هسته دار مشابه بودند.

همان گونه که قبلا نیز اشاره شد برای آزمون rep-PCR نیاز به تهیه DNA خالص نیست (Schadd, 2001; Louws, 1994) و نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد DNA الگو با هر سه روش پیشنهادی دارای نتایج مشابهی است (شکل ۳).

¹ Marker

² Cluster

بحث

این تحقیق نشان داد وجود پلی مورفیسیم مشابه (۵ و ۱۴) در توالی REP ژنوم جدایه های ایرانی *P. syringae* pv. *syringae* می تواند جدایه های مربوط به پاتوار *syringae* را به طور اختصاصی انگشت نگاری و شناسائی نماید.

جدایه های مورد مطالعه در دو گروه مجزا قابل بررسی بودند :

۱- جدایه هایی که باندهای الکتروفورز آنها تقریباً شبیه به هم و تنها در چند باند با یکدیگر تفاوت بودند.

۲- جدایه هایی که تفاوت زیادی در الگوی باندهای REP داشتند (شکل ۴).

بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می رسد جدایه ها نسبت به میزبان خود تخصص پیدا کرده اند. آغازگر REP در آزمون rep-PCR همانند پرایمر ERIC قادر است تفاوت ژنتیکی بین پاتوارها را به خوبی مشخص نماید که این نتیجه با نتایجی که توسط Louws *et al.* (1994) به دست آمده مطابقت دارد. با استفاده از این پرایمر جدایه های درختان میوه هسته دار در مقایسه با جدایه های گیاهان زراعی در یک خوشه بزرگ قرار گرفتند که نشانگر سازگاری این جدایه ها با میزبان خود می باشد. این تخصص جدایه های *P. syringae* pv. *syringae* در تحقیقات دیگری نیز نشان داده شده است. Little *et al.* (1998) با استفاده از آغازگر ERIC مشخصات ژنتیکی جدایه های *P. syringae* pv. *syringae* را در میزبان های مختلف بررسی نمودند. این محققین نشان دادند که به سبب قرار گرفتن جدایه های درختان میوه هسته دار در مقایسه با سایر جدایه ها در یک خوشه بزرگ این فرضیه را تأیید و تقویت نمود که برخی جدایه های پاتوار *syringae* قادرند به صورت ژنتیکی با میزبان خاص تعامل و سازگاری داشته باشند. Legard *et al.* (1993) با استفاده از روش RFLP، جدایه های *P. syringae* pv. *phaseoli* را که از میزبان های متفاوت جداسازی شده بودند آنالیز و جدایه های لوبیا را در یک گروه و خوشه مجزا طبقه بندی کردند.

Denny *et al.* (1988) شش جدایه *P. syringae* pv. *syringae* را با استفاده از RFLP

مورد بررسی قرار دادند. جدایه ها در دو خوشه جداگانه گروه بندی شدند. یکی از این خوشه ها شامل دو لپه ای ها و تک لپه ای ها و گروه دیگر مربوط به جدایه *P. syringae* pv. *tomato* می شده که تفاوت ژنتیکی کمتری نسبت به سایر جدایه ها داشت.

در تحقیق دیگر که بر پایه نتایج RFLP و آنالیز پلی مورفیک تصادفی DNA^۱ بود

(Scholz *et al.*, 1994)، مشخص گردید که جدایه های *P. syringae* pv. *apii* عامل آلودگی های غلات سازگاری ژنتیکی بیشتری نسبت به دیگر جدایه ها دارند.

¹ Randomly amplified polymorphic DNA analysis

در تحقیق حاضر نیز جدایه های درختان میوه هسته دار در مقایسه با جدایه های گیاهان زراعی از سازگاری ژنتیکی بیشتری برخوردار بودند. بنابراین جدایه های مذکور نسبت به میزبان و شرایط محیط خود دارای سازگاری ژنتیکی بیشتر و پلی مرفیسم کمتر بودند. دو جدایه GJ و T2 که از روی درختان گردو یک منطقه جدا شده بودند شباهت زیادی به جدایه های دیگر گردو از منطقه جغرافیائی مشابه داشتند. با توجه به شباهت ژنتیکی این دو جدایه و قرار گرفتن آنها در یک خوشه مجزا، به نظر می آید که این یک نوع سازگاری تخصصی نسبت به میزبان و یا منطقه جغرافیایی خود بوده باشد. تحلیل فوق با نتایج تحقیقات (Little *et al.* (1998) مطابقت دارد.

به نظر می رسد استفاده از پرایمر REP در آزمون rep-PCR روشی سریع و دقیق برای بررسی پلی مورفیسم در حد پاتوار می باشد، بدون آنکه نیاز به DNA خالص باکتری باشد، به طوری که در این روش می توان از کلنی باکتری بطور مستقیم به عنوان DNA الگو استفاده نمود. با وجود این در روش استفاده از سوسپانسیون جوشانده باکتری چنانچه جمعیت باکتری بیش از 10^6 cfu/ml باشد نتیجه کار بهتر خواهد بود. در روش سوم که از کلنی خالص استفاده شد، مقدار کلنی انتقال یافته در کیفیت باندها تاثیر بسزائی داشت و بالاخره در مورد روش استفاده مستقیم از برگ گیاه، اگر برگ مورد مطالعه خرد اما له نگردد نتیجه بهتری خواهد داشت.

پیش از این نیز سرعت، دقت و توانائی این روش در خصوص جدایه های *P.syringae* و *Xanthomonas* نیز توسط (Louws *et al.* (1998) به اثبات رسیده است.

به علاوه تفاوت در دامنه میزبانی، منطقه جغرافیائی و تکامل تدریجی میکروارگانیسم ها با خصوصیات میزبان خود باعث تغییرات جزئی در ژنوم باکتری ها شده است که این نظر با نتایج تحقیقات (Louws *et al.* (1994) ، Little *et al.* (1998) و Clerc *et al.*, (1998) منطبق است. قدر مسلم تفسیر و تائید این نظر و نظرات مشابه نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

توالی کاملاً اختصاصی REP که از توالی های تکرار شونده ژنوم باکتری می باشد، باعث افزایش دقت، سرعت و کارآیی بالای روش rep-PCR می باشد. این روش در مطالعات مربوط به شناسایی و طبقه بندی باکتری ها توصیه می گردد.

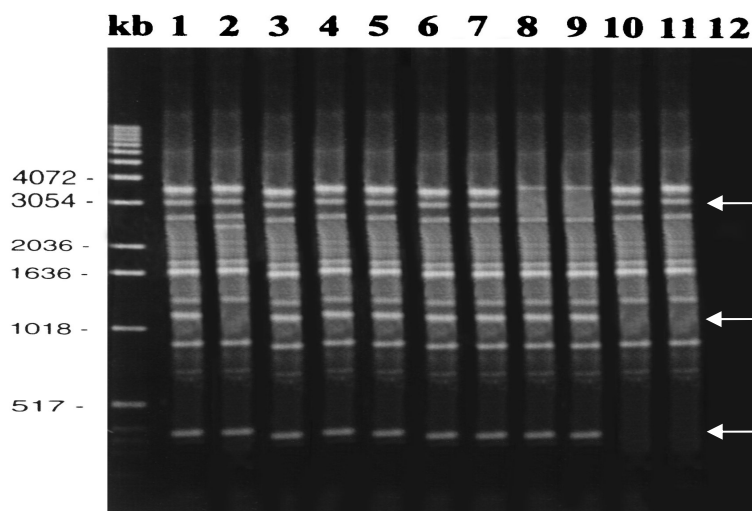
جدول ۱- مشخصات جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در آزمون

Rep - PCR		
کد جوایه	میزبان	منطقه نمونه برداری اهدا کننده
۱ K	بادام	زرقان/ الف
۷ K	بادام	زرقان/ الف
۲۴ K	بادام	زرقان/ الف
۱۳ K	بادام	زرقان/ الف
۱۵ K	بادام	زرقان/ الف
۱۸ K	بادام	زرقان/ الف
۱۲ K	بادام	زرقان/ الف
۲۶ K	بادام	زرقان/ الف
B۲۳	بادام	مهارلو/ ه
B ۲۴	بادام	مهارلو/ ه
GHIB	گردو	استان تهران / ب
GHIB	گردو	استان تهران / ب
G2	گردو	استان تهران / ب
Gj	گردو	استان تهران / ب
T2	گردو	استان تهران / ب
Ch ۱۸	گیلاس	ساوجیلاخ / ج
Ch ۲۰	گیلاس	ساوجیلاخ / ج
Ch ۱۲	گیلاس	ساوجیلاخ / ج
Ch ۱۴	گیلاس	دماوند/ ج
Z ۱۶	زرد آلو	کرج / ج
P ۱۹	هلو	شهریار/ ج
P ۲۰	هلو	برغان / ج
W ۳۳	گندم	شهر کرد / ه
N ₁ ۲	نیشکر	استان مازندران / د
BPIC 242	درخت میوه هسته دار	یونان / و

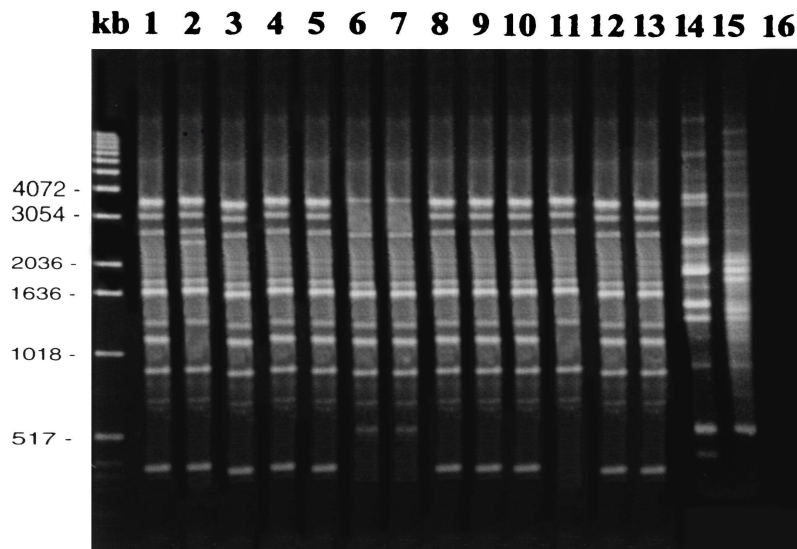
ه) دکتر ض، بنی هاشمی
و) دکتر م، محمدی

ج) مهندس ا، قاسمی
د) دکتر ح، رحیمیان

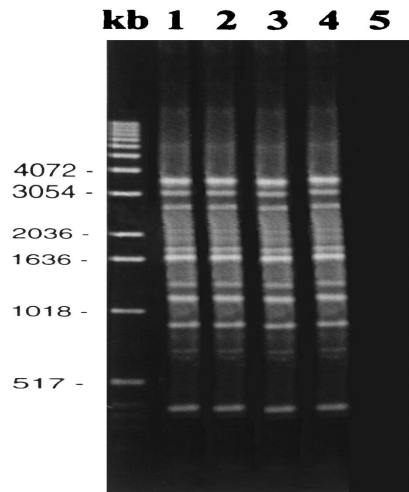
الف) جدا شده در این تحقیق
ب) دکتر ن، حسن زاده



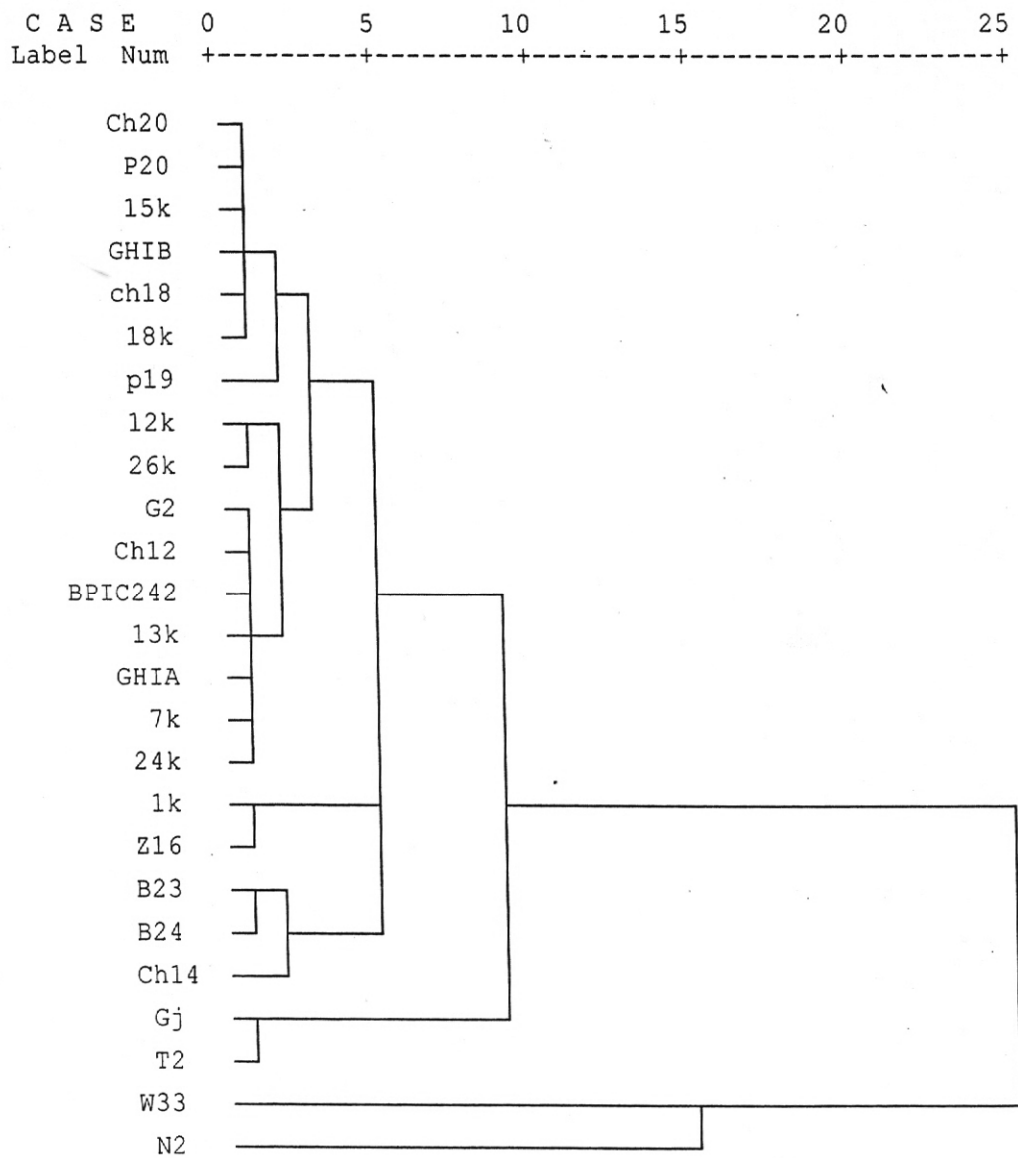
شکل ۱- الگوی انگشت نگاری rep-PCR ، جدایه بادام *P. syringae* با استفاده از DNA الگوی به روش جوشاندن-فریز کردن. مقدار ۸-۵ میکرولیتر از هر مخلوط Rep-PCR در چاهکها ریخته و در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. *P. syringae* pv. BPIC ۲۴۲ (ردیف ۱)، ۱K (ردیف ۲)، ۷K (ردیف ۳)، ۲۴K (ردیف ۴)، ۱۳K (ردیف ۵)، ۱۵K (ردیف ۶)، ۱۸K (ردیف ۷)، ۱۲K (ردیف ۸)، ۲۶K (ردیف ۹)، B_{۲۳} (ردیف ۱۰)، B_{۲۴} (ردیف ۱۱)، آب مقطر (ردیف ۱۲).
- (فلش ها نشان دهنده جایگاه باند هایی است که در آن تغییر دیده شده است).



شکل ۲- الگوی انگشت نگاری rep-PCR جدایه های مختلف *P. syringae* جدا شده از میزبان های مختلف با استفاده از DNA الگوی تهیه شده با روش جوشاندن -فریز کردن. مقدار ۵-۸ میکرولیتر از هر مخلوط rep-PCR در چاهکها ریخته و در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. نقوش بدست آمده شامل: *P. syringae* BPIC ۲۴۲ (ردیف ۱)، Z۱۶ (ردیف ۲)، GHIB (ردیف ۳)، GHIA (ردیف ۴)، G_۲ (ردیف ۵)، GJ (ردیف ۶)، T_۲ (ردیف ۷)، Ch_{۱۸} (ردیف ۸)، Ch_{۲۰} (ردیف ۹)، Ch_{۱۲} (ردیف ۱۰)، Ch_{۱۴} (ردیف ۱۱)، P_{۱۹} (ردیف ۱۲)، P_{۲۰} (ردیف ۱۳)، W_{۳۳} (ردیف ۱۴)، N_۲ (ردیف ۱۵) و آب مقطر (ردیف ۱۶).



شکل ۳- مقایسه الگوی انگشت نگاری *P. syringae* pv. *syringae*.
 استرین استاندارد ۲۴۲ BPIC که DNA الگوی آن به روشهای مختلف تهیه شده است. نتایج الکتروفورز شامل: DNA الگوی تهیه شده با روش جوشاندن -فریز کردن (ردیف ۱)، جوشاندن سوسپانسیون باکتری (ردیف ۲)، سلول خالص باکتری (ردیف ۳) برگ خیس داده شده و خرد شده در آب مقطر و استفاده از آب حاوی سلول باکتری به عنوان DNA الگو (ردیف ۴) و آب مقطر به عنوان شاهد منفی (ردیف ۵)



شکل ۴- دندروگرام بدست آمده از مقایسه الگوی انگشت نگاری REP ۲۵ جدایه *P. syringae* pv. *syringae*.

منابع

- Bradbury, J. F. 1986. *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, p.175-177. In: *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
- Bendict, A. A., Alvarez. M., & Pollar. L. W. 1990. Pathovar specific antigens of *Xanthomonas caperstris* pv. *begoniae* and *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* detected with monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 572-574.
- Berthier, Y., Verdier, V., Guesdon, J., Chevrier, D., Denis, J., Decoux, G. & Lemattree, M. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by RNA gene restriction patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 851-859.
- Cheng, G. Y., Legard, D. E., Hanter, J. E. & Barr, T. J. 1989. Modified bean pod assay to detect strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that cause bacterial brown spot snap bean. *Plant Disease*, 73: 419-423.
- Clerc, A., Mancaeu, C., Nesme, X. 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1180-1187.
- De Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacteria repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to finger print the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2180-2187.
- Denny, T. P., Gilmour, M. N., & Selander, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Genetic Microbiology*, 134: 1949-1960.
- Dye, D. W., Bradbury, F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliot, R. A. & Schroth, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59: 153-168.
- Gilbertson, R. L., Maxwell, D. P., Hagedorn, D. J., & Leong, S. A. 1989. Development and application of plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. *Phytopathology*, 79: 518-525.
- Gross, B. C., Cody, Y. S., Proebsting, E. L., Rademaker, Jr. G. K. & Spots, R. A. 1984. Ecotypes and pathogenicity of Ice nucleation active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology*, 74: 241-284.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. & Huisman, O. C. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basis for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 235-256.
- Legard, D. E., Aquardo, C. F. & Hunter, J. E. 1993. DNA sequence variation and phloglogenetic relationships among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* inferred from restriction site maps and restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4180-4188.

- Little, E. L., Bostock, R. M. & Kirkpatrick, B. C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain from stone fruits in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3818-3823.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & De Bruijn, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 2286-2292.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus *Pseudomonas migula*. 1894, pp. 141-198. In: Holt, J. G. & Kreig, N.R. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Roos, I. M. M. & Hahingh, M. J. 1987. Pathogenicity and numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas syringae* strains isolated from deciduous fruit trees. *Phytopathology*, 77: 900-908.
- Schadd, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (Eds.). 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edition, American Phytopathology Society Press, St. Paul. MN. USA.
- Scholz, B. K., Jakobek, J. L. & Lindgren, P. B. 1994. Restriction fragment length, polymorphism evidence of genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1093-1100.
- Sokal, R. R. & Sneath, P. H. A. 1963. Principles of numerical taxonomy, pp. 169-210. W.H. freeman and Co., San francisco. California, USA.
- Stead, D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and other *Pseudomonas* species by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic of Bacteriology*, 42: 281-295.
- Vanzyl, E. & Steyn, P. L. 1990. Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomons* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, 13: 60-71.
- Vauterin, L., Swings, J. & Kersters, K. 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS PAGE of proteins. *Journal of Genetic Microbiology*, 137: 1677-1687.
- Vauterin, L., Vantomme, R., Pot, B., Hoste, B., Swings, J., & Kertser, K. 1990. Taxonomic analysis *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii* by means of phytopathological phenotypic protein electrophoretic and DNA hybridization methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 13: 166-176.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application fingerprinting bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19: 6823-6831.
- Young, J. M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv *syringae* Van Hall 1902. *Annual Applied Biology*, 118: 283-298.
- Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L. & Stead, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 67-105.