

بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی و الگوی rep-PCR باکتری *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* عامل بلایت باکتریایی گردو در استان کهگیلویه و بویر احمد

سیده هاجر بانو موسوی پور^۱ و گیلدا نجفی پور^{۲*}

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران
۲- *نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران (g_najafipour@jia.ac.ir)
(gilda_najafi@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۲۶

چکیده

بیماری بلایت باکتریایی گردو ناشی از *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*)، یکی از مهمترین بیماری‌های درخت گردو است که در حضور رطوبت و دمای مناسب، خسارت زیادی را به گردو وارد می‌کند. طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱، تعدادی نمونه ی برگ و میوه ی گردو، مشکوک به بیماری بلایت باکتریایی از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد جمع آوری شده و در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۲۵ جدایه ی گرم منفی با پرگنه‌های ریز، نسبتاً برجسته و زرد رنگ، هوازی اجباری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت جداسازی و بطور اولیه بعنوان *Xaj* تلقی و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام شد. کلیه ی جدایه‌ها قادر به هیدرولیز نشاسته و تولید H₂S از سیستمین بوده و روی محیط کشت YDC پرگنه‌های زرد رنگ ایجاد نمودند. نتایج بدست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی و نیز آزمون اثبات بیماریزایی روی میوه گردو، وجود باکتری *Xaj* را در استان کهگیلویه و بویراحمد محرز نمود. این اولین گزارش از وجود بیماری مذکور در این استان است. در بررسی خصوصیات ژنوتیپی در واکنش rep-PCR و با استفاده از نرم افزار NTsys-Pc، جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۳ درصد در دو گروه قرار گرفتند؛ اما گروه‌بندی خاصی براساس منطقه جغرافیایی میزبان، در میان آنها قابل مشاهده نبود. این نتیجه نشان می‌دهد احتمالاً جدایه‌های *Xaj* در مناطق مختلف استان، دارای منشأ یکسانی هستند.

کلید واژه‌ها: ایران، بلایت باکتریایی گردو، تنوع ژنوتیپی، rep-PCR *Xaj*

از *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

می‌باشد. این بیماری در اکثر مناطق گردو خیز جهان وجود دارد و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی، سبب ایجاد خسارتی بین ۵۰ تا ۸۰ درصد محصول می‌شود (Belisario, et al., 1997).

بیماری بلایت باکتریایی گردو، جوانه، برگ، دمیرگ، دمگل، سرشاخه، شاتون، مادگی، میوه‌چه و مغز گردو را مورد حمله قرار می‌دهد. بافت‌های آبدار جوان نسبت به سایر بافت‌ها حساس‌ترند. باکتری از طریق منافذ

مقدمه

گردو در اغلب کشورهای معتدله که تابستان‌های ملایمی داشته باشند پرورش داده می‌شود. در ایران، به ترتیب استان‌های فارس، همدان، کردستان و کهگیلویه و بویراحمد دارای مقام‌های اول تا چهارم از لحاظ میزان تولید گردو در کشور هستند (Behdad, 1981). از مهمترین عوامل کاهش کمیت و کیفیت این محصول، بیماری‌ها و آفات مختلف آن است. یکی از مهمترین بیماری‌های گردو، بیماری بلایت باکتریایی گردو ناشی

در ایران، پژوهندگان مختلفی، بیماری بلایت باکتریایی گردو را در مناطق مختلف کشور مورد ارزیابی قرار داده اند. اولین بار اسفندیاری در سال ۱۳۲۶ با مطالعات اولیه ی نمونه-های مشکوک که از بابل، آمل و رشت جمع آوری شده بود، بیماری مذکور را شناسایی و عامل آن را *Pseudomonas juglandis* نامید (Behdad, 1981).

Amani (1974, 1977) با بررسی باغات گردو کاری قزوین و تاکستان از فارسجین قزوین نمونه‌های بیماری را مورد بررسی قرار داد. وی براساس خصوصیات بیماریزایی، بیوشیمیایی و فنوتیپی، عامل بیماری را *Xanthomonas juglandis* (Pierce) Dowson 1939 گزارش نمود.

Mahsoul et al. (1989) آلودگی به بلایت باکتریایی گردو را از چند منطقه در استان مازندران گزارش و با جداسازی پاتوژن عامل بیماری، آزمون‌های بیوشیمیایی و اثبات بیماری زایی را روی آن‌ها انجام داد. در نهایت براساس خصوصیات بیماریزایی، فنوتیپی و بیوشیمیایی، باکتری عامل را *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* Dowson 1937 تشخیص و گزارش نمود.

Golmohammadi et al. (2002) بیماری بلایت باکتریایی و پوسیدگی مغز گردو را در استان‌های غربی، مرکزی و شمالی کشور مورد مطالعه قرار داده و برخی خصوصیات فنوتیپی، بیماریزایی و الکتروفورز پروتئین‌های سلولی عامل بیماری را گزارش نمودند.

Soltani and Alizadeh (2002) ضمن بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی بر باکتری *Xaj*، تنوع ژنوتیپی گردوی استان همدان در واکنش به باکتری عامل بلایت گردو را نیز بررسی نمودند.

بیماری بلایت باکتریایی گردو تاکنون از تاکستان، قزوین، تفرش، گیلان، مازندران، همدان، لرستان (Mohammadpour, 2004)، زنجان، گلستان، آذربایجان شرقی، تهران، مرکزی و اردبیل (Azadbakht et al., 2006) گزارش شده اما از وجود بیماری در استان کهگیلویه و بویراحمد اطلاعی در دسترس نیست. با توجه به سطح زیرکشت بالای گردو در استان کهگیلویه و بویر احمد و نیز

طبیعی مثل روزنه‌ها و بافت‌های زخمی به درون میزبان نفوذ می‌کند (Belisario, et al., 1997). شیوع بیماری با میزان بارندگی در طی چهار هفته ابتدایی بعد از شکوفه‌دهی، ارتباط مستقیم دارد. علائم بیماری در برگها، ابتدا به صورت نقاط کوچک آسوخته است که پس از توسعه، ایجاد لکه‌های ۴-۲ میلیمتری بافت مرده زوایه‌ای می‌کند (Bradbury, 1986). آلودگی در برگ‌های در حال رشد منجر به بدشکلی می‌شود (Golmohammadi et al., 2002). علائم در روی سرشاخه‌ها، ابتدا به صورت نقاط بسیار ریز نیمه شفاف و آسوخته است که با توسعه بیماری حالت شانکر می‌گیرند. شاخه‌هایی که کاملاً چوبی نشده‌اند ممکن است مورد حمله بیماری قرار گیرند، ولی پس از چوبی شدن از مقاومت کافی برخوردار می‌شوند. آلودگی میوه می‌تواند منجر به خسارت شدید اقتصادی گردد و منجر به ریزش میوه شود (Lang and Evans, 2010).

بیماری بلایت باکتریایی گردو برای اولین بار از استرالیا گزارش گردید (Bradbury, 1986). Pierce (1901) باکتری عامل بیماری را جداسازی و بیماری‌زایی آن را اثبات نموده و نام آن را *Pseudomonas juglandis* نهاد. سپس عامل بیماری، به عنوان یک باکتری هوازی اجباری، گرم منفی، زرد رنگ، کاتالاز مثبت و میله‌ای شکل توصیف شد (Bradbury, 1986). در آخرین رده‌بندی جنس زانتوموناس، عامل بیماری بلایت باکتریایی گردو *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) نامیده شد. همچنین براساس همولوژی DNA-DNA، DNA-rRNA، آزمون‌های سرولوژیکی، الکتروفورز پروتئین، آنالیزهای اسیدهای چرب و خصوصیات فنوتیپی، در گروه چهار همولوژی زانتوموناس قرار گرفت. در رده‌بندی پلی‌فازی، براساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، گونه‌های زانتوموناس در بیست گروه همولوژی قرار گرفتند، که گونه مذکور در گروه همولوژی چهار قرار گرفت (Vauterin et al., 1995).

حساسیت، کاتالاز، رشد هوازی و بی هوازی، تولید لوان و سایر آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بر اساس روش‌های استاندارد باکتری شناسی گیاهی (Schaad et al., 2001) انجام شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی سویه‌ها، روی میوه‌های سالم گردو انجام گردید. به این منظور، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی 10^8 CFU بر میلی‌لیتر (OD₆₀₀=1) تهیه و روی میوه‌ها با استفاده از سوزن استریل، زخم‌های ریزی ایجاد گردید. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی زخم‌ها قرار داده شد. میوه‌های مایه‌زنی شده درون جعبه‌های پلاستیکی درب داری قرار داده شدند. به منظور تامین رطوبت از پنبه‌های استریل آغشته به آب مقطر سترون استفاده و میوه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. میوه‌های شاهد، با همین روش و با آب مقطر سترون تلقیح شده و در شرایط مشابه با تیمار نگهداری شدند. ده روز بعد از مایه‌زنی، میوه‌های شاهد و تیمار، از نظر ایجاد یا عدم علائم بیماری، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون سنجش حساسیت به آنتی‌بیوتیک

در آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی استفاده شد. این آنتی‌بیوتیک‌ها شامل جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، کانامایسین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میلی‌گرم در دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، تتراسایکلین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک)، پنی‌سیلین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، کلوکساسیلین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک)، سفالوسین (۵ میلی‌گرم در دیسک)، آمیکاسین (۱۰ میلی‌گرم در دیسک) و نیتروفورانثونین (۳۰ میلی‌گرم در دیسک) بود. در بررسی نتایج، وجود هر گونه هاله‌ی بازدارنده بعنوان حساسیت به آنتی‌بیوتیک و عدم ایجاد آن بعنوان مقاومت تلقی گردید.

مشاهده علائم مشابه با بیماری بلایت گردو، ردیابی و مطالعه بیماری در استان ضروری به نظر می‌رسید. تحقیق حاضر با هدف تشخیص بیماری در استان و نیز مطالعه‌ی تنوع احتمالی ژنوتیپی سویه‌های *Xaj* با استفاده از روش rep-PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ درختان گردو در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویر احمد مورد بازدید قرار گرفته و از برگ و میوه‌ی دارای علائم مشابه بلایت باکتریایی نمونه برداری صورت گرفت (شکل ۱). نمونه‌ها درون کیسه‌های کاغذی و سپس کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفته و در شرایط خشک و خنک به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت جداسازی عامل بیماری، ابتدا برگ‌ها و میوه‌ها توسط آب روان، بخوبی شستشو و به مدت دو دقیقه در هیپو کلریت سدیم تجاری ۰/۵٪ ضد عفونی شده و سپس توسط آب مقطر سترون شستشو شدند (Schaad et al., 2001). قسمت‌هایی از برگ‌ها و میوه‌های دارای علائم در حد فاصل بین ناحیه بیمار و آلوده در آب مقطر سترون عصاره گیری شد. سپس به وسیله یک لوپ، در شرایط استریل، سوسپانسیون روی محیط کشت‌های (Nutrient agar) YDC (Yeast extract-dextrose-CaCO₃ و NA) agar کشت داده شد. تشک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تا ظهور پرگنه‌های باکتریایی نگهداری گردید. پس از ۷۲-۴۸ ساعت، تک پرگنه‌های ریز و نسبتاً برجسته و زرد رنگ انتخاب و جهت خالص‌سازی باکتری، مجدداً روی محیط کشت NA به صورت مخلط کشت داده شد. در مجموع ۲۵ جدایه‌ی گرم منفی، هوازی اجباری و کاتالاز مثبت جداسازی و بطور اولیه بعنوان *Xaj* تلقی گردید. این جدایه‌ها به منظور آزمون‌های تکمیلی فنوتیپی، ژنوتیپی و بیوشیمیایی، در یخچال، درون آب مقطر سترون نگهداری شدند. آزمون‌های فنوتیپی شامل آزمون اکسیداز، فوق

۰/۵ میکرولیتر (5U/μL) Taq DNA Polymerase، ۱ میکرولیتر از هر یک از Primer F (10μM) و Primer R (10μM)، ۳ میکرولیتر سوسپانسیون جوشانده ی باکتری و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب مقطر سترون بود.

برای بررسی نتایج واکنش PCR، ژل آگاروز ۱٪ تهیه و محصولات بدست آمده، الکتروفورز شدند (Sambrook et al., 1989). به این منظور، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با ۲ میکرولیتر از رنگ پیشرو، مخلوط و درون چاهک‌ها ریخته شد. جهت تخمین اندازه قطعات DNA ی تکثیر شده، از مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی (شرکت Fermentas، آلمان)، که به همراه نمونه‌ها در ژل بارگذاری شده بود استفاده شد. الکتروفورز به مدت یک ساعت در ولتاژ ثابت ۷۰ انجام شد. پس از الکتروفورز، با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری گردید.

آنالیز داده‌های ژنوتیپی

با استفاده از نرم افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Ntsys-pc Rohlf, 2002) فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید (Rohlf, 2000). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد بر اساس مارکرهای مولکولی، به صورت وجود یا عدم وجود نوار در ژل مشخص شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted Pair-Group method (UPGMA) using Arithmetic Average و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده گردید.

نتایج

از برگ و میوه‌های درختان بیمار با علائم سوختگی با حاشیه زرد رنگ روی برگ و سیاه شدگی روی میوه (شکل ۱)، تعداد ۲۵ جدایه باکتریایی گرم منفی، زردرنگ با حاشیه صاف، مدور و براق روی محیط

بررسی خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌ها تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی

به این منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری، سوسپانسیونی به غلظت 10^8 cfu/ml ($OD_{600}=1$) تهیه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن سوسپانسیون حاصله به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و از فاز رویی آن مستقیماً جهت انجام آزمون PCR استفاده گردید (Yaish, 2006).

آزمون rep-PCR

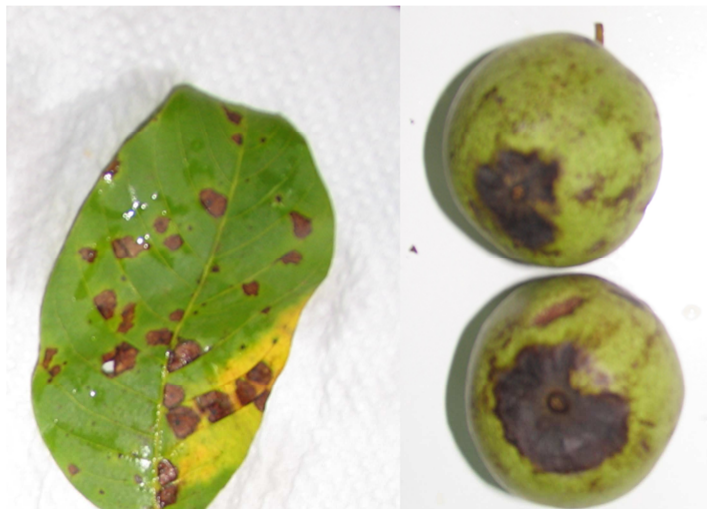
جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xaj*، از روش rep-PCR و آغازگرهای REP1/REP2 (Versalovic et al., 1997) و ERIC1/ERIC2 برای تکثیر قطعات، بین نواحی محافظت شده rDNA استفاده گردید. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در روش rep-PCR (محصول شرکت سیناژن-ایران)، شامل: IIIICGICGICATCIGGC (REP 1R) و ICGICTTATCIGGCCTAC (REP 2) در REP-PCR و ATGTAAGTCTCTGGGGATTAC (ERIC1R) و AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG (ERIC2) در ERIC-PCR و CTACGGCAAGGCGACGCTGACG (BOX AIR) برای BOX-PCR بود (Versalovic et al., 1997).

چرخه دمایی مورد استفاده در این روش شامل: یک سیکل با دمای واسرشتگی اولیه در دمای 95°C و به مدت ۳ دقیقه؛ ۳۵ سیکل با دمای واسرشتگی 94°C به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن آغازگرها به مدت ۱ دقیقه و دماهای 52°C برای آغازگرهای ERIC، 42°C برای آغازگرهای REP و 50°C برای آغازگر BOX، امتداد ۲ دقیقه در دمای 72°C و نهایتاً یک سیکل امتداد نهایی به مدت ۴ دقیقه در دمای 72°C انجام شد. مقدار مواد مورد نیاز در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل: ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۱/۲۵ میکرولیتر $dNTPs$ (10μM)، $MgCl_2$ (50mM) ۰/۵ میکرولیتر

آزمون سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک

در آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها براساس وجود یا عدم هاله بازدارنده، جدایه‌ها در دو گروه حساس و مقاوم به آنتی بیوتیک قرار گرفتند. تمام جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰ میلی گرم در دیسک)، کانامایسین (۳۰ میلی گرم در دیسک)، آمیکاسین (۱۰ میلی گرم در دیسک)، سیروفلوکساسین (۵ میلی گرم در دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی گرم در دیسک) و تتراسایکلین (۳۰ میلی گرم در دیسک) حساس و به سایرین مقاوم بودند (جدول ۳).

کشت NA جداسازی گردید. مشخصات جدایه‌ها در جدول یک آمده است. کلیه ی جدایه‌ها هوازی اجباری، کاتالاز مثبت و قادر به رشد در محیط‌های حاوی نمک طعام دو درصد بودند. همچنین قادر به هیدرولیز نشاسته، تولید لوآن، تجزیه ی توئین ۸۰ و ذوب ژلاتین بودند. جدایه‌ها روی برگ‌های گیاه شمعدانی قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت بودند. هیچکدام از جدایه‌ها قدرت تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کشت KB را نداشتند. سایر نتایج در جدول ۲ ثبت شده است.



شکل ۱- علائم بیماری بلایت باکتریایی گردو بر روی میوه و برگ گیاه آلوده در سی سخت

Figure 1. Walnut bacterial blight symptoms on leaf and fruit of diseased plant in Seesakht.

Xaj، شناسایی شده بودند، در آزمون rep-PCR مورد

استفاده قرار گرفتند (شکل‌های ۳ تا ۵).

آنالیز عددی خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌های *Xaj*

با استفاده از سه آغازگر REP، ERIC و BOX، با

استفاده از نرم افزار Ntsys-pc version 2.02 بطور

جداگانه و نیز ترکیبی انجام شد.

در آنالیز نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات

بین نواحی حفاظت شده، با استفاده از آغازگر REP و در

آزمون rep-PCR، جدایه‌های باکتریایی در سطح تشابه ۹۳

درصد به دو گروه تقسیم شدند. گروه یک شامل جدایه-

های Y1، Y2، C1، C8، C9، Y6، Y4، C2، B1، B2،

آزمون اثبات بیماریزایی روی میوه گردو

در آزمون بیماری‌زایی روی گردو بعد از ده روز

لکه‌های سیاه مدوری روی میوه‌ها ظاهر گردید. لکه‌ها

ابتدا به صورت نکروز همراه با ترشحات سیاه رنگی

روی میوه ظاهر گردیدند، سپس این لکه‌ها گسترش

یافته و به صورت لکه‌های سیاه بزرگی مدوری بر روی

میوه ظاهر گردیدند. طی همین مدت در گیاه شاهد

علائمی مشاهده نگردید (شکل ۲).

بررسی خصوصیات ژنوتیپی

بیست و پنج جدایه ی باکتریایی که براساس

آزمون‌های بیوشیمیایی، فنوتیپی و بیماری‌زایی بعنوان

جدایه‌های Y1، Y2، C1، C8، C9، Y6، Y4، C2، B3، Y4، C3، D3، D4، Y5، C6، C7، B5، Y3، D1 و C4 و گروه دوم شامل جدایه‌های B4، D2 و C4 بودند (شکل ۶).
با استفاده از آغازگر BOX، جدایه‌ها در سطح تشابه ۸۹ درصد به دو گروه تقسیم شدند، که در گروه یک در گروه دوم قرار گرفت (شکل ۷).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* جدا شده از برگ و میوه درختان گردو استان کهگیلویه و بویراحمد

Table1. Characteristics of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, isolated from walnut's leaf and fruit in Kohgilouye and Boyer Ahmad province

Code of isolate	Plant tissue	Location of sampling
Y2	Leaf	Yasouj
Y5	Fruit	Yasouj
Y6	Fruit	Yasouj
C4	Leaf	Seasakht
C2	Leaf	Seasakht
D1	Leaf	Dehdasht
B2	Leaf	Bahmaee
B4	Fruit	Bahmaee
B3	Fruit	Bahmaee
B1	Leaf	Bahmaee
Y4	Fruit	Yasouj
C3	Leaf	Seasakht
C1	Leaf	Seasakht
D2	Leaf	Dehdasht
C7	Fruit	Seasakht
D3	Fruit	Dehdasht
D4	Leaf	Dehdasht
Y1	Leaf	Yasouj
C6	Fruit	Seasakht
C5	Fruit	Seasakht
C8	Leaf	Seasakht
C9	leaf	Seasakht
Y3	leaf	Yasouj
Y7	Fruit	Yasouj
B5	Leaf	Bahmaee

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* عامل سوختگی باکتریایی گردو در استان کهگیلویه و بویراحمد

Table 2. Phenotypic characteristics of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates, casual agent of walnut bacterial blight in Kohgilouye and Boyer Ahmad province.

Test name	Result	Test name	*Result
3% NaCl tolerance	-	Gram reaction(3% KOH)	-
Starch hydrolysis	+	Oxidative growth	+
Endol production	-	Oxidase reaction	-
Levan production	+	Xanthomonadin production	+
Glucose	+	catalase	+
D-alanine	-	lecitinas	+
L- arabinose	-	H2S production from cystein	+
L- asparagines	+	Gelatin hydrolysis	+
Cellobiose	+	Arginine dehydrolase	-
D- ribose	+	Tween hydrolysis	+
D- sorbitol	-	Asculine hydrolysis	+
L-rhamnose	-	Geranium hypersensitive urease	+
D- mannitol	-		-
L- serin	+	Growth at 35°C	+
D- melibiose	+	Fluorescent on KB	-
L- arabitole	+	Yellow pigment on YDC	+
Sucrose	+	2%NaCl tolerance	+
Mannose	+	Swarming movement	+

*+ تولید واکنش؛ - عدم واکنش

*+ Reaction was seen; - reaction was not seen

آنالیز ترکیبی خصوصیات ژنوتیپی با سه آغازگر REP، BOX و ERIC جدایه‌ها را در سطح احتمال ۸۲ درصد در دو گروه قرار داد که گروه یک شامل Y1، Y2، C1، C8، C9، Y6، Y4، C2، B1، B2، B3، Y4، C3، D3، D4، Y5، C6، C7، D2، C4، B5، Y3، D1 و C4 بود و تنها جدایه B4 در گروه دو قرار گرفت (شکل ۹).

با استفاده از آغازگر ERIC، جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۳ درصد در دو گروه قرار گرفتند که در گروه یک جدایه‌های Y1، Y2، C1، C8، B4، Y6، Y4، C2، B1، B2، B3، Y4، C3، D3، C5، D4، Y5، C6، C7، D2، C4، B5، Y3، D1 و C4 و در گروه دوم جدایه C9 قرار گرفت (شکل ۸).

جدول ۳- نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام سویه‌های *Xanthomonas axonopodis* pv. *juglandis* جدا شده از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد

Table 3. Antibioqram results of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolated from various area in Kohgilouye and Boyer Ahmad province

Antibiotic	result*
tetracyclin	+
chloramphenicol	+
amoxicillin	-
nitrofurantoin	-
amikacin	+
cloxacillin	-
kanamycin	+
cephalexin	-
gentamycin	+
ciprofloxacin	+
penicillin	-

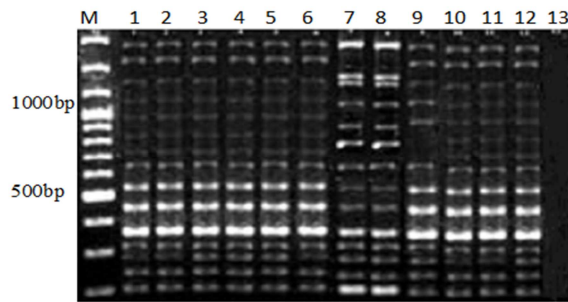
*: + جلوگیری از رشد (حساس)، - عدم جلوگیری از رشد (مقاوم).

*+ growth inhabitation (susceptible), - growth as usual (resistance)



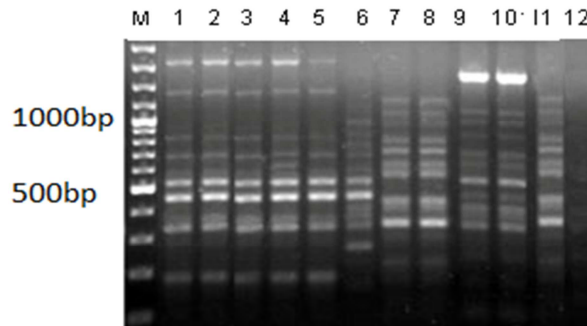
شکل ۲- نتیجه آزمون بیماری‌زایی سویه *Xanthomonas axonopodis* pv. *juglandis*، جدا شده از برگ گردوی سی سخت (C1)؛ سمت راست شاهد، سمت چپ تیمار

Figure 2. Pathogenicity test result of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, isolated from walnut leaf in Seesakht (C1); right, control; left treatment.



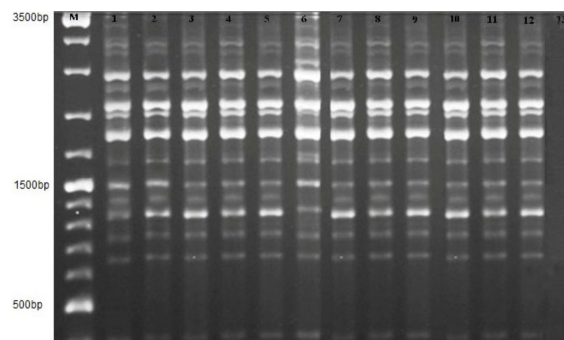
شکل ۳- اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر REP: M، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ لاین ۱، Y1؛ لاین ۲، Y2؛ لاین ۳، B2؛ لاین ۴، B3؛ لاین ۵، D3؛ لاین ۶، C6؛ لاین ۷، C5؛ لاین ۸، C2؛ لاین ۹، C7؛ لاین ۱۰، C8؛ لاین ۱۱، D4؛ لاین ۱۲، Y7 و لاین ۱۳، آب مقطر استریل (کنترل منفی).

Figure 3. Genetic fingerprint of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates, using REP primers: M, 100bp molecular weight marker; lane1, Y1; lane2, Y2; lane3, B2; lane4, B3; lane5, D3; lane6, C6; lane7, C5; lane8, C2; lane9, C7; lane10, C8; lane11, D4; lane12, Y7 and lane13, distilled water (negative control).



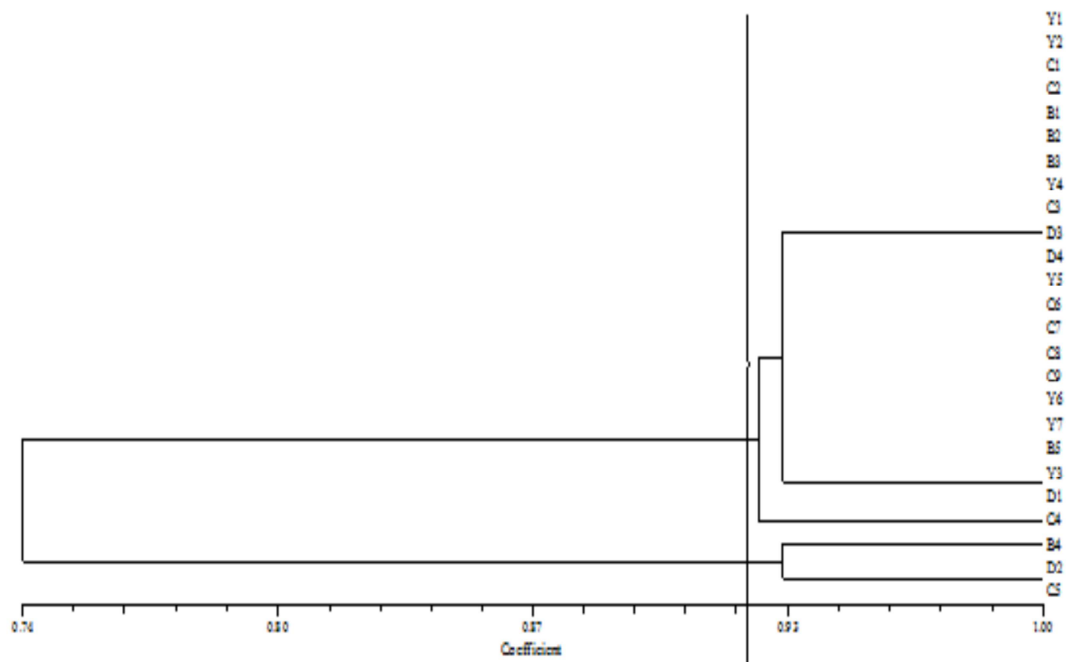
شکل ۴- اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *Juglandis* با استفاده از آغازگر ERIC: M، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ لاین ۱، Y1؛ لاین ۲، Y2؛ لاین ۳، Y3؛ لاین ۴، C1؛ لاین ۵، B1؛ لاین ۶، C3؛ لاین ۷، C5؛ لاین ۸، D3؛ لاین ۹، C9؛ لاین ۱۰، C7؛ لاین ۱۱، Y7 و لاین ۱۲، آب مقطر استریل (کنترل منفی).

Fig 4. Genetic fingerprint of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* isolates, using ERIC primers: M, 100bp molecular weight marker; lane1, Y1; lane2, Y2; lane3, Y3; lane4, C1; lane5, B1; lane6, C3; lane7, C5; lane8, D3; lane9, C9; lane10, C7; lane11, Y7 and lane12, distilled water (negative control).



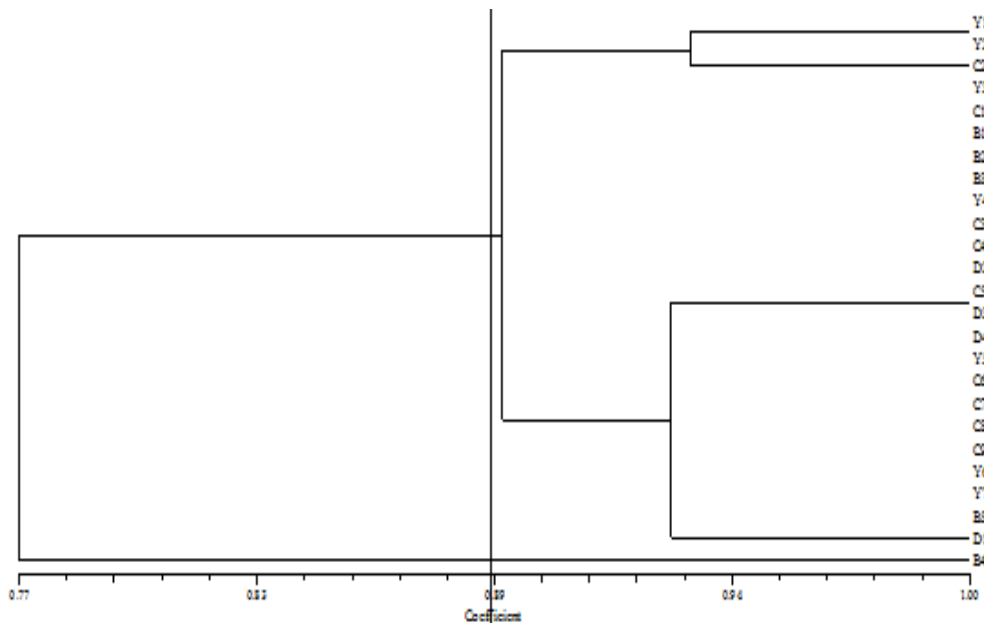
شکل ۵- اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* با استفاده از آغازگر Box: M، مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ لاین ۱، Y3؛ لاین ۲، C1؛ لاین ۳، B2؛ لاین ۴، B1؛ لاین ۵، D4؛ لاین ۶، B4؛ لاین ۷، C3؛ لاین ۸، C4؛ لاین ۹، C6؛ لاین ۱۰، D3؛ لاین ۱۱، Y5؛ لاین ۱۲، Y6 و لاین ۱۳، آب مقطر استریل (کنترل منفی).

Figure 5. Genetic fingerprint of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* isolates, using BOX primer: M, 100bp molecular weight marker; lane1, Y3; lane2, C1; lane3, B2; lane4, B1; lane5, D4; lane6, B4; lane7, C3; lane8, C4; lane9, C6; lane10, D3; lane11, Y5; lane12, Y6 and lane13, distilled water (negative control).



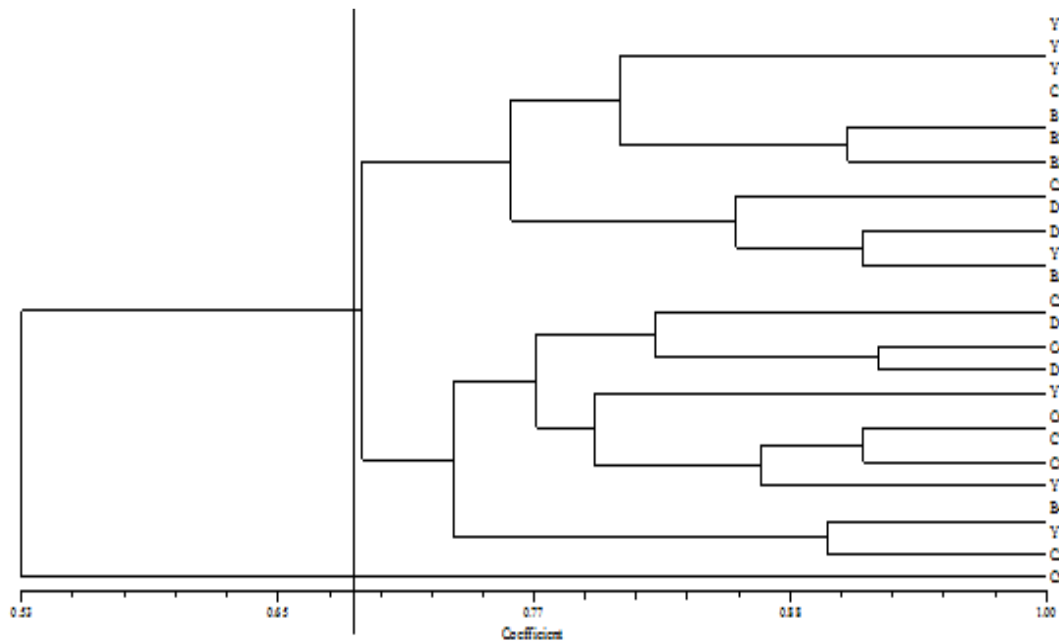
شکل ۶- دندروگرام جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر REP. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Figure 6. Dendrogram related to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates using REP primers in rep-PCR test. Characteristics of isolates were shown in table 1.



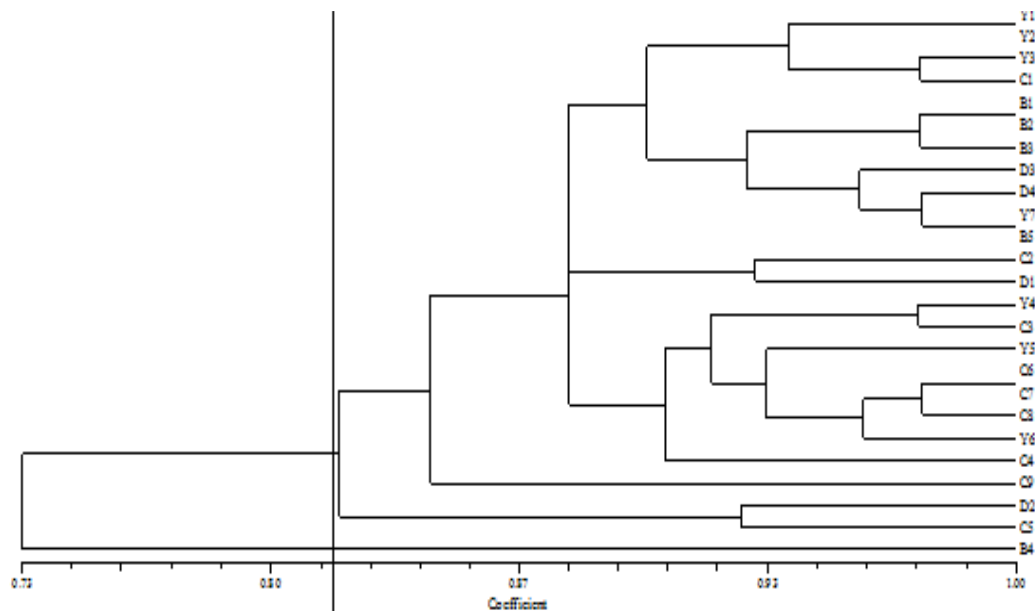
شکل ۷- دندروگرام جدایه‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* در روش rep-PCR با استفاده از آغازگر Box. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Fig 7. Dendrogram related to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates, using BOX primers in rep-PCR test. Characteristics of isolates were shown in table 1.



شکل ۸- دندروگرام جدایه‌های *X. arboricola* pv. *juglandis* در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Figure 8. Dendrogram related to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates using ERIC primers in rep-PCR test. Characteristics of isolates were shown in table 1.



شکل ۹- دندروگرام ترکیبی جدایه‌های *X. Arboricola* pv. *juglandis* در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای REP و ERIC BOX. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Figure 9. Dendrogram related to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates using BOX, ERIC and REP primers in rep-PCR test. Characteristics of isolates were shown in table 1.

بحث

طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ درختان گردو در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویر احمد شامل یاسوج، سی سخت، دهدشت و بهمعی مورد بازدید قرار گرفته و از برگ و میوه‌های دارای علائم مشابه بلایت باکتریایی نمونه برداری صورت گرفت. از بافت‌های مورد بررسی ۲۵ جدایه بدست آمد که همگی متحرک، گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودند. همچنین از قندهای سلوبیوز، گلوکز و مانوز، اسید تولید کردند. جدایه‌ها قادر به هیدرولیز نشاسته و تولید H_2S از سیستمین بوده و روی محیط کشت YDC پرگنه‌های زرد رنگ ایجاد کردند. جدایه‌ها براساس آزمون‌های افتراقی (Mahsoul et al., 1989; Azadbakht et al., 2002; Golmohammadi et al., 2006; Ashrafi et al., 2010; Gardan et al., 2000; Fahy and Persley, 1983; Schaad et al., 2001) شامل عدم تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت KB، تولید پرگنه‌های لعابی و گنبدی روی محیط کشت NAS، استفاده از قندها و اسید آمینه‌های گلوکز، سوکروز، دی ریبوز، دی مانوز، ال سرین، سلوبیوز، ال آرابینوز، ال آسپاراژین، دی ملی بیوز، ال آرابیتول و عدم استفاده از دی مانیول، دی آلانین، دی سوربیتول، ال رامنوز و دی آلانین بعنوان *Xaj* تشخیص داده شدند. در برخی آزمون‌ها تفاوت‌هایی میان نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر و یافته‌های سایر پژوهندگان به چشم می‌خورد. بعنوان مثال در بررسی‌های انجام شده توسط Mahsoul et al. (۱۹۸۹) جدایه‌ها در هیدرولیز نشاسته و توئین ۸۰ با همدیگر تفاوت داشتند، در حالیکه در مطالعه حاضر، جدایه‌ها از این جهت تفاوتی با یکدیگر نشان نمی‌دادند. همچنین در پژوهش Golmohammadi et al. (2002) بین جدایه‌ها در قابلیت هیدرولیز نشاسته، ژلاتین و کازئین، تحمل نمک طعام و استفاده از سوربیتول و آل-آلانین تفاوت وجود داشت. علاوه بر این نتایج آزمون اکسیداز در تحقیق حاضر منفی ارزیابی شد که با

نتایج Mohammadpour (2002) مغایر است. وی در بررسی خود در استان آذربایجان شرقی جدایه‌های عامل بلایت گردو را اکسیداز مثبت گزارش کرد.

در آزمون فوق حساسیت، سوسپانسیون باکتری به درون برگ‌های شمعدانی تزریق شد. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت لکه‌های سوخته سفیدرنگ و خشکی ایجاد شد که نشان دهنده مثبت بودن آزمون و در نتیجه تاییدی بر بیماری‌زا بودن جدایه‌های مذکور است.

نتایج آزمون‌های فنوتیپی نشان داد که کلیه جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی نسبتاً یکنواخت بوده و تنها در مواردی اختلافات اندکی در خصوصیات تغذیه‌ای یا بیوشیمیایی داشتند. این تفاوتها بسیار ناچیز بوده و موجب تمایز جدایه‌ها به گروه‌های مختلف نگردید.

آزمون بیماری‌زایی اصلی‌ترین و مهمترین آزمون به منظور تعیین بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا بودن باکتری‌های جداسازی شده از گیاهان می‌باشد. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های مورد مطالعه، روی میوه‌های گردو انجام گرفت که علائم بیماری بعد از ۱۰ روز به صورت نقاط سیاه و مدوری بر روی میوه‌های گردو ظاهر گردید. این نتیجه نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد بررسی متعلق به پاتووار *X. a. juglandis* بودند، زیرا براساس تعریف اولیه پاتووار، تشخیص قطعی هر پاتووار تنها از طریق انجام آزمون روی میزان اصلی و اولیه امکانپذیر است (Dye et al., 1980).

در آزمون حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک، کلیه جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین، کاناماسین، کلرامفنیکل، سیروفلوکساسین و تتراسایکلین حساس بودند. بنابراین در اجرای برنامه‌های تلفیقی کنترل بیماری، می‌توان در کنار سایر روش‌ها، این آنتی بیوتیک‌ها را نیز مورد استفاده قرار داد. در مقابل همه جدایه‌ها نسبت به آنتی-بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلوکساسیلین، نیتروفوران توئین، سفالوسین و پنی‌سیلین مقاوم بودند. اکثر این آنتی بیوتیک‌ها از گروه بازدارنده‌های سنتز دیواره سلولی (لایه پپتید و گلیکان) هستند. این نتیجه دور از ذهن نبود زیرا

جدایه ی *X. c. citri* که از میزبان‌های مختلف در مناطق شرقی مالزی جداسازی شده بود با استفاده از rep-PCR به کلاسترهای مختلفی تقسیم بندی شدند که با منطقه جغرافیایی آن‌ها تطابق داشت (Arshadi et al., 2013). از طرف دیگر، نتیجه‌ی پژوهش حاضر با یافته‌های تعدادی از پژوهش‌های پژوهندگان ایرانی روی *Xaj* و پاتووارها و گونه‌های نزدیک با *Xaj* تطابق دارد. Saeedi *X. a.* Madani et al. (2010)، ۳۷ جدایه‌ی *malvacearum* را که از بوته‌های پنبه در استان‌های سمنان و گلستان جمع‌آوری شده بود با آزمون rep-PCR مورد مطالعه قرار داده و اذعان نمودند که هیچ گروه‌بندی یا اختلاف ژنتیکی معنی‌داری میان جدایه‌های این دو استان وجود نداشت. در تحقیقی دیگر ۲۵ جدایه‌ی *X. c. citri* از استان‌های فارس، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان با rep-PCR ارزیابی شدند. نتایج آن‌ها نیز نشان داد غیر از جدایه‌های سیستان و بلوچستان که در گروهی متمایز قرار گرفتند، سایر جدایه‌ها با یکدیگر اختلاف ژنتیکی چندانی نداشته و در یک کلاستر واحد قرار گرفتند. آن‌ها علت جدا شدن سویه‌های سیستان و بلوچستان از سایر سویه‌ها را شرایط اقلیمی خاص این استان عنوان نمودند (Rezaei et al., 2012). با توجه به یافته‌های این تحقیق و پژوهش‌های مشابه، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود علیرغم توانایی rep-PCR برای جداسازی سویه‌های مختلف *Xaj* که از کشورهای مختلف جمع‌آوری شده‌اند، استفاده از این روش احتمالاً برای تمایز سویه‌های متعلق به یک منطقه جغرافیایی خاص مانند یک استان، مناسب بنظر نمی‌رسد.

قدردانی

نویسندگان مقاله ی حاضر، بدینوسیله از حمایت و همکاری‌های معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، از جهت فراهم نمودن شرایط مناسب برای انجام این پروژه سپاسگزاری می‌نمایند.

بسیاری از باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی حساسیت کمتری نسبت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (Schaad et al., 2001).

در پژوهش حاضر بیست و پنج جدایه *Xaj* در آزمون rep-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از این نشانگرها، منجر به تکثیر قطعاتی از DNA با اندازه‌هایی مختلف در جدایه‌ها گردید.

در آزمون rep-PCR، آنالیز نقوش الکتروفورزی حاصل از تکثیر قطعات بین نواحی حفاظت شده، با استفاده از آغازگرهای REP، BOX و ERIC، جدایه‌های باکتریایی به ترتیب در سطح تشابه ۹۳٪، ۸۹٪ و ۷۳٪ به دو گروه تقسیم شدند. آنالیز ترکیبی خصوصیات ژنوتیپی *Xaj*، با هر سه آغازگر REP، BOX و ERIC، نیز جدایه‌ها را در سطح احتمال ۸۲ درصد در دو گروه قرار داد.

در مجموع، با دقت در نقوش حاصل از واکنش rep-PCR و آنالیز نرم افزاری آن‌ها، تشابه بالایی میان جدایه‌ها مشاهده شد. نتایج حاصله نشان داد که با استفاده از آغازگرهای سه‌گانه rep-PCR به تنهایی و با بصورت ترکیبی، جداسازی سویه‌های مختلف *Xaj* از یکدیگر در استان کهگیلویه و بویراحمد امکان‌پذیر نیست. بر همین اساس می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های مختلف *Xaj* در استان مذکور، از لحاظ خصوصیات ژنوتیپی براساس rep-PCR و آغازگرهای REP، ERIC و BOX تنوع بسیار پائینی دارند. این نتیجه با یافته‌های برخی پژوهندگان مغایرت دارد. بعنوان مثال Scortichini et al. (2011) با مطالعه ۶۱ سویه باکتری که از سراسر دنیا جمع‌آوری شده بود، دریافتند که براساس rep-PCR سویه‌ها به گروه‌های متمایزی دسته بندی می‌شوند که با منطقه جغرافیایی آن‌ها تطابق دارد. آن‌ها چنین نتیجه‌گیری نمودند که احتمالاً در این مناطق گیاهچه‌های محلی تولید و استفاده شده است و به همین دلیل سویه‌های خاصی با این گیاهان تطابق یافته‌اند (Scortichini et al., 2001). در تحقیقی دیگر نیز، ۲۵

REFERENCES

- Amani, B. 1974. Bacterial blight of walnut. Proceedings of 5th Iranian plant protection congress. P: 62. (in Persian, with English abstract)
- Amani, B. 1977. Bacterial blight of walnut in Iran. Iranian journal of Plant Pathology, 13: 15-23. (in Persian, with English abstract)
- Arshadi, F., Kamaruzaman, S. and Yahya Bin, A. 2013. Genetic diversity of *xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker. Journal of Plant Protection Research, 53: 312-316.
- Ashrafi, J., Keshavarzi, M. and Hasan zade, N. 2010. Recognition of walnut bacterial blight agent and its affected area in Ilam province. Proceedings of 19th Iranian plant protection congress. P: 404.
- Azad Bakht, N., Golmohammadi, M., Rahimian, H. and Mobaraki, D. 2006. Report of walnut bacterial blight in Lorestan province. Proceedings of 17th Iranian plant protection congress, P: 318. (in Persian)
- Behdad, A. 1981. Disease of Iranian Fruit Trees. Iranian pests and plant disease protection Institute press. P: 397. (in Persian)
- Belisario, A. 1997. The principal Diseases of walnut in Italy. Horticultural Abstracts, 67: 482.
- Bradbury, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. 198-260.
- Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., Schroth, M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotypes. Review of Plant Pathology, 59: 153–168.
- Fahy, P. C., and Persley, G. J. 1983. Plant bacterial diseases. A diagnostic guide. Academic Press Australia. 316pp.
- Gardan L., Dauga C., Prior P., Gillis M., and Saddler G.S. 2000. *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 235–246.
- Golmohammadi, M., Alizade, A., and Rahimian, H. 2002. Homogeneity of Walnut bacterial blight isolates in the northern and central provinces of Iran. Iranian plant protection journal, 38: 11-20. (in Persian with English abstract).
- Lang, M., and Evans, K. 2010. Epidemiology and status of walnut blight in Australia. Journal of Plant Pathology, 92: 49-55.

- Mahsoul, F., Rahimian, H., Majidi, A., and Zakeri, Z. 1989. Walnut bacterial blight in Mazandaran province. Proceedings of 9th Iranian plant protection congress. P: 148. (in Persian)
- Mohammad pour, M. 2004. Occurrence of walnut bacterial blight in Azerbaijan. Proceedings of 16th Iranian plant protection congress. P: 386.
- Pierce, N. B. 1901. Walnut bacteriosis. Journal of Botany, 31: 272-278.
- Rezaei, M., Shams-Bakhsh, M., and Alizadeh, A. 2012. Genetic Diversity Among *Xanthomonas citri* Subsp. *citri* Strains in Iran. Journal of Plant Protection Research, 52:1-9.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York.
- Saeedi Madani, A., Marefat, A., Behboudi, K. and A. Ghasemi, A. 2010. Phenotypic and genetic characteristics of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, causal agent of cotton blight, and identification of races in Iran. Australasian Plant Pathology. 39: 440-445
- Sambrook J., Fritschi, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press, Minnesota. 373pp.
- Scortichini, M., Marchesi, U and Diprospero, P. 2001. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricolapv. juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. Journal of Phytopathology, 149: 325-332.
- Soltani, J., and Alizade, A. 2002. Genotypic diversity of walnut trees to walnut bacterial blight in Hamadan province. Proceedings of 15th Iranian plant protection congress. P: 243. (in Persian)
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 472-489.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. 1997. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Journal of Nucleic Acids Research, 19(24): 6823-6831.
- Yaish, M. W. F. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in common bean. Euphytica, 152: 397-404.

Genotypic characteristics of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, causal agent of walnut bacterial blight, based on Rep-PCR in Kohgiluyeh and Boyer- ahmad province

Mousavi Pour S. Haajar Baanoo¹ and Najafi Pour Gilda^{2*}

1. Former B.Sc. student, Department of Plant Protection, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran (g_najafipour@jia.ac.ir, gilda_najafi@yahoo.com)

Received: 16 August 2016

Accepted: 13 May 2018

Abstract

Background and objective

Walnut bacterial blight, caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*) is one of the most important diseases, causing severe damage at the presence of moisture and the optimal temperature for the development of the disease. The aim of this study was walnut bacterial blight detection, in Kohgiluyeh and Boyer- Ahmad province and evaluation of genetic diversity of *Xaj* strains using rep-PCR.

Materials and methods

During 2011-1012, several samples of walnut's leaf and fruit, showed bacterial blight symptoms, were collected from Kohgiluyeh and Boyer- Ahmad province of Iran. Bacterial isolates were studied with bacteriological standard methods. Moreover, genetic fingerprint of *Xaj* strains were evaluated and phylogenetic tree of them was drawn.

Results

Twenty five isolates of *Xaj* were showed small, relatively prominent with yellow colony. All isolates were oxidative, Gram and oxidase negative but catalase positive. They hydrolyzed starch and able to produce H₂S from cystein and formed yellow colonies on YDC medium.

Discussion

On the basis of biochemical, phenotypical and virulence test, presence of *Xaj* in Kohgiluyeh and Boyer- Ahmad province, was revealed. This is the first report of walnut bacterial blight disease in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province. Genotypic characterization of isolates also was assayed with rep-PCR. All isolates were similar at 73% similarity level, but any relationship among clusters and geographic area were not observed.

Key words: *Xaj*, walnut bacterial blight, rep-PCR. genotypic variation.