

بررسی تنوع بیماری‌زایی و ژنوتیپی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* عامل سوختگی باکتریایی برنج

مسعود صاحبی^۱ - سعید طریقی^{۲*} - پریسا طاهری^۳ - مرتضی گلدانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۱

چکیده

به منظور بررسی تنوع بیماری‌زایی و ژنوتیپی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) ایجاد کننده سوختگی باکتریایی برنج، در تابستان ۱۳۹۱ از مزارع برنج شهرستان‌های رشت، صومعه‌سرا، رضوان‌شهر، دابودشت امل و مؤسسه تحقیقات برنج گیلان، از گیاهان دارای علائم زردی و سوختگی در برگ نمونه‌برداری به عمل آمد. جدایه‌های باکتری به روش‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شدند. در نهایت ۱۷ جدایه به منظور بررسی تنوع بیماری‌زایی و ژنوتیپی انتخاب شدند. جدایه‌ها بر اساس توان بیماری‌زایی بر روی رقم حساس و بین المللی Tetep در سه گروه بیماری‌زا قرار گرفتند. تنوع ژنوتیپی ۱۷ جدایه با استفاده از روش rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ۳۳ باند ایجاد شده بر اساس نشانگرهای REP، نشان‌دهنده وجود سه گروه ژنوتیپی با حداقل شباهت ۶۲ درصد در میان جدایه‌ها بود. نتایج حاصل نشان‌دهنده ارتباط محدود بین گروه‌های بیماری‌زا و گروه‌های ژنوتیپی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)، بیماری‌زایی، ژنوتیپ

مقدمه

است. جدایه‌های مختلف باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* دارای تنوع ژنوتیپی بالایی می‌باشند. بررسی‌های مولکولی بر روی ۳۰۸ سویه از کشورهای مختلف آسیایی کره، مالزی، نپال و فیلیپین نشان دهنده تنوع بالای میزبانی و ژنوتیپی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* بوده است (۴). آنالیزهای توالی یابی چند ژنی نشان‌دهنده سه دودمان ژنتیکی در باکتری *X. oryzae* بوده است که شامل دودمان سویه‌های آسیایی *X. oryzae* pv. *oryzae*، سویه‌های آسیایی و آفریقایی *X. oryzae* pv. *oryzicola* به همراه سویه‌های آفریقایی *X. oryzae* pv. *oryzae* است. آنالیزهای فیلوژنی نشان داده است که سویه‌های آفریقایی و آسیایی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* به دودمان‌های ژنتیکی متفاوتی تعلق داشته و *X. oryzae* pv. *oryzae* متعلق به آفریقا دارای برخی از ویژگی‌های مشترک با سویه‌های *X. oryzae* pv. *oryzicola* هستند (۲۹).

در ایران بیماری سوختگی باکتریایی برنج در اثر باکتری *X. oryzae* بر روی دو رقم امل ۱ و امل ۳ تنها با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی از روی بذر برنج گزارش شد (۲). سپس عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تحت عنوان *X. oryzae* pv. *oryzae* از خزانه‌های استان گیلان گزارش شد (۴). در سال ۱۳۸۸ عامل این بیماری در مزارع برنج استان گیلان گزارش شد (۱). در مطالعه‌ای دیگر نیز تنوع ژنوتیپی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae*

بیماری سوختگی باکتریایی برنج برای اولین بار در سال ۱۸۸۴ در جنوب شرق ژاپن دیده شد (۲۴). این بیماری با عامل باکتریایی *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) از جمله مهم‌ترین بیماری‌های برنج در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا به ویژه کشورهای آسیایی است (۶). این بیماری علاوه بر کشورهای آسیایی در بخش‌هایی از غرب آفریقا و همچنین در استرالیا، آمریکای لاتین و کشورهای امریکای مرکزی نیز گزارش شده است (۱۷). باکتری عامل بیماری از راه زخم‌ها و یا هیداتوئدهای موجود در سطح برگ به داخل برگ نفوذ کرده و در فضای بین سلولی بافت پارانشیمی تکثیر و از طریق آوندهای چوبی در گیاه پخش می‌شود (۱۹). علائم بیماری ابتدا به صورت نقاط آبسوخته در نوک برگ دیده می‌شود و سپس نواحی رگبریگی شروع به زرد شدن می‌کنند. علائم بیماری معمولاً از مرحله پنج زنی آغاز و تا قبل از به خوشه رفتن گیاه میزبان اتفاق می‌افتد (۱۸).

برهمکنش میزبان - باکتری در این بیماری بسیار تخصص یافته

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) نویسنده مسئول: (Email: starighi@um.ac.ir)
۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

انجام واکنش PCR سوسپانسیونی از باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت سه دقیقه در دور 8000 rpm سانتریفیوژ شده و از فاز رویی در PCR استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل $2/5$ میکرولیتر بافر $10x$ ، $1/5$ میکرولیتر $MgCl_2$ ، $0/5$ میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکو مول، $0/2$ میکرولیتر آنزیم DNA *Taq* پلی-مراز، ۲ میکرولیتر DNA نمونه و $16/3$ میکرولیتر آب مقطر دوبار سترون انجام شد.

چرخه حرارتی با واسرشته سازی اولیه DNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه آغاز و سی و پنج چرخه شامل واسرشته سازی DNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سی ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه امتداد نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۰). ژل آگارز یک درصد تهیه و محصول PCR به همراه مارکر ۳ کیلو جفت باز (تهیه شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌ها بارگذاری و به مدت چهل دقیقه در ولتاژ ۹۵ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل عکس‌برداری شد. سپس محصول PCR مورد توالی‌یابی قرار گرفت.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

برای انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی ابتدا گیاهان برنج مورد نظر در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شدند. غلظت باکتری‌ها با استفاده از میزان جذب نوری برابر یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. گیاهان ۳۰ روزه برای مایه‌زنی انتخاب و با استفاده از روش برش برگ^۳ مایه‌زنی شدند (۷). گیاهان تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت در زیر پلاستیک و در شرایط مرطوب قرار داده شده و سپس گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۳۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت دو هفته نگهداری شدند. گیاهان شاهد نیز با استفاده از آب مقطر سترون تیمار شدند.

گروه‌بندی جدایه‌ها در گروه‌های بیماری‌زا

جهت دسته‌بندی جدایه‌ها بر اساس ویژگی و قدرت بیماری‌زایی از دو رقم بومی هاشمی و خزر و رقم بین‌المللی و حساس Tetep استفاده شد. گیاهان ۳۰ روزه برای مایه‌زنی انتخاب و با استفاده از روش برش برگ مایه‌زنی شدند (۷). گیاهان تیمار شده به مدت ۲۴

استان گیلان با استفاده از تکثیر تصادفی چند شکلی DNA (RAPD)^۵ مورد بررسی قرار گرفت (۲۷). رستمی و همکاران (۳) نیز باکتری *Xanthomonas sp.* را از بذور برنج مزارع استان مازندران جداسازی کردند.

با توجه به تنوع ژنوتیپی بالای باکتری عامل سوختگی برگ برنج و تخصص یافتگی میزبانی آن، هدف از انجام این مطالعه بررسی چگونگی ارتباط و وابستگی بین ویژگی‌های بیماری‌زایی و ژنوتیپی باکتری *X.oryzae pv. oryzae* بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی عامل بیماری

نمونه‌برداری از مزارع برنج شهرستان‌های رشت، صومعه‌سرا، رضوان‌شهر، دابودشت آمل و مؤسسه تحقیقات برنج گیلان و از گیاهانی که حاوی برگ‌هایی با علائم زردی و سوختگی بودند انجام شد. برای جداسازی عامل بیماری ابتدا برگ‌ها به وسیله اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی سطحی شدند. سپس با استفاده از قیچی سترون برگ‌ها به خوبی خرد و له شده و در آب مقطر دو بار سترون به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. با استفاده از لوپ سترون مقداری از سوسپانسیون باکتری درشتک‌های پتری حاوی محیط Nutrient Agar به صورت مخطط کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت، پرگنه‌های زرد رنگ از روی محیط کشت انتخاب و خالص‌سازی شدند.

پس از جداسازی، عامل بیماری به روش‌های فنوتیپی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. برای تعیین خصوصیات فنوتیپی در سطح جنس، تست گرم با استفاده از KOH سه درصد، وجود رنگدانه زانتومونادین، آزمون اکسیداز، کاتالاز، آزمون هوازی/بی‌هوازی، تولید رنگ فلورسنت بر روی محیط King'B انجام و نتایج حاصل با ویژگی‌های جنس زانتوموناس در منابع مقایسه گردید (۲۳). علاوه بر آزمون‌های فوق، جهت شناسایی جدایه‌ها در سطوح گونه و پایین‌تر از گونه از آزمون‌های هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، رشد موکوتیدی بر روی محیط YDC، رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۲۳) و هم‌چنین آزمون‌های شیر لیت‌موس و حساسیت به $0/001$ درصد نیترات مس (۲۶) انجام شد. برای آزمون فوق حساسیت نیز از گیاه شمعدانی استفاده گردید (۲۳).

برای شناسایی مولکولی جدایه‌ها از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)^۲ و از آغازگرهای SSU primers با توالی (5'-uni-F و 3'-TGCCAGCAGCCGCGTA-uni-R و 5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') استفاده شد (۱۰). برای

5- Random amplified polymorphism DNA
2- Polymerase Chain Reaction

نتایج

جداسازس و شناسایی عامل بیماری

پس از ۷۲-۴۸ ساعت کلنی‌هایی به رنگ زرد و به قطر یک تا دو میلی‌متر در تشتک پتری حاوی محیط NA مشاهده شد. کلنی‌ها به روش تک کلنی انتخاب و خالص شدند.

با توجه به نتیجه آزمون‌های انجام شده و گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودن جدایه‌ها، رشد هوازی، وجود رنگدانه زانتومونادین و عدم تولید رنگ فلورسنت در محیط King's B، تمامی جدایه‌ها در جنس *Xanthomonas* قرار گرفتند (۲۳). بر اساس سایر آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی از جمله عدم توانایی جدایه‌ها در هیدرولیز نشاسته، رشد موکوئیدی بر روی محیط YDC، واکنش‌های متفاوت در استفاده از ژلاتین و توانایی رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، جدایه‌ها در گونه *X. oryzae* قرار گرفتند (۲۳). هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به لخته کردن شیر لیموس نبوده و نسبت به نیترات مس ۰/۰۰۱ درصد حساسیت نشان ندادند و بر اساس این نتایج جدایه‌ها به عنوان *X. oryzae* pv. *oryzae* شناسایی شدند (۲۶). هم‌چنین تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت بر روی گیاه شمعدانی در مدت ۴۸ ساعت بودند. در نهایت ۱۷ جدایه بر اساس پراکنش مزارع مورد بازدید شامل ۴ جدایه XoA (مؤسسه تحقیقات برنج گیلان)، ۳ جدایه XoE (صومعه سرا)، ۳ جدایه XoG (رضوان شهر)، ۳ جدایه XoF (رشت) و ۴ جدایه XoK (دابودشت) انتخاب شدند. به منظور تأیید شناسایی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات مولکولی از آغازگرهای رفت و برگشت SSU primers استفاده گردید. ناحیه S ۱۶rDNA توسط آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر گردید. در نهایت باند ۹۴۰ جفت‌بازی مربوط به جدایه XoA3 (مؤسسه تحقیقات برنج گیلان) مورد تعیین توالی قرار گرفت و BLAST توالی جدایه مذکور در بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که جدایه مورد نظر متعلق به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* است.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

در آزمون اثبات بیماری‌زایی از روش برش برگ استفاده شد. علائم ابتدا به صورت لکه‌های آب‌سوخته بر روی قسمت‌های فوقانی برگ مشاهده شد. به تدریج با نفوذ باکتری به داخل برگ‌ها، زردی به تدریج بخش‌هایی از برگ‌های تیمار شده را فراگرفت. پس از گذشت چند روز در جدایه‌های با توان بیماری‌زایی بالا تمامی برگ مایه‌زنی شده زرد و شروع به خشک شدن نمود. از برگ‌های مایه‌زنی شده مجدداً عامل بیماری‌زا جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفت. در برگ‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر هیچ گونه علائمی مبنی بر زردی و سوختگی برگ مشاهده نشد.

ساعت در زیر پلاستیک و در شرایط مرطوب قرار داده شده و سپس گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۸-۳۲ درجه سانتی‌گراد درجه و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت دو هفته نگهداری شدند. برای هر جدایه تعداد سه برگ در هر رقم برای مایه‌زنی انتخاب شد و برای محاسبه میزان ناحیه نکروزه برای هر جدایه میانگین طول ناحیه نکروزه در سه برگ مایه زنی شده مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵) آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودار با استفاده از برنامه Excel 2013 انجام شد.

آزمون Rep-PCR

برای بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌ها از واکنش rep-PCR استفاده شد. برای این منظور از آغازگرهای BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')، ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') و ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۷ میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکو مول، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA پلی‌مراز، ۲/۵ میکرولیتر DNA مورد نظر و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار سترون انجام شد.

چرخه حرارتی با واسرشته سازی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه آغاز و سی و پنج چرخه شامل واسرشت DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سی ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 و دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای آغازگر BOXA1R، امتداد در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای واکنش BOX-PCR و به مدت ۵ دقیقه برای واکنش ERIC-PCR و در نهایت یک چرخه امتداد نهایی در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۶). ژل آگارز یک و نیم درصد تهیه و محصول PCR به همراه مارکر ۳ کیلو جفت‌باز (تهیه شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌ها بارگذاری و به مدت دو ساعت در ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری شد.

فاصله یا شباهت ژنوتیپی بین جدایه‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود باند در ژل مشخص گردید. خصوصیات ژنوتیپی به صورت کد یک (در صورت وجود باند) و کد صفر (در صورت عدم وجود باند) تعریف و با استفاده از نرم‌افزار Ntsys pc2.02 و ضریب تشابه جاکارد و برنامه UPGMA، دندروگرام مربوط به تنوع ژنوتیپی جدایه‌ها رسم شد.

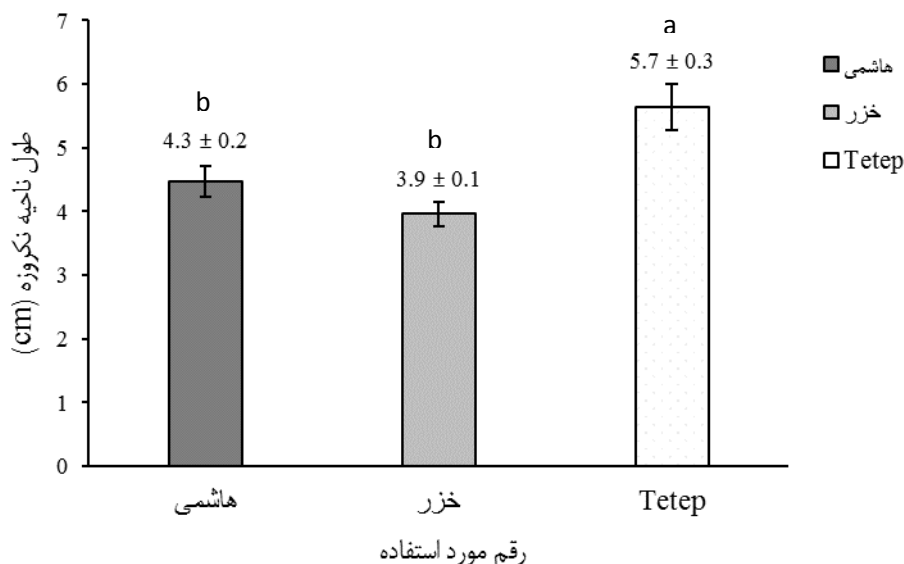
طول ناحیه نکروزه در این جدایه‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از مایه زنی بین ۸-۶/۵ سانتی‌متر بود. هفت جدایه XoA1، XoA2، XoA3، XoE1، XoE2، XoG2 و XoG3 در این گروه جای گرفتند. گروه بیماری‌زای II شامل جدایه‌های با توان بیماری‌زایی متوسط بود. میانگین طول ناحیه نکروزه در این جدایه‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از مایه‌زنی بین ۴/۶-۵ سانتی‌متر بود. چهار جدایه XoG1، XoE3، XoF1 و XoK4 در این گروه قرار گرفتند. گروه بیماری‌زای III شامل جدایه‌های کم بیماری‌زا بود. میانگین طول ناحیه نکروزه در این جدایه‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از مایه زنی کمتر از ۵ سانتی‌متر بود. شش جدایه XoA4، XoF2، XoF3، XoK1، XoK2، XoK3 و XoK4 در این گروه جای گرفتند.

آزمون Rep-PCR

در آزمون rep-PCR از آغازگرهای BOXA1R، ERIC1R و ERIC2 استفاده شد. بیشترین تعداد باند تکثیر شده توسط آغازگر BOXA1R و ERIC1R و ERIC2 به ترتیب ۱۵ و ۱۸ باند و مجموع کل باندها در هر دو واکنش برابر ۳۳ باند بود. از بین ۳۳ باند، تعداد ۲۱ باند دارای چند شکلی بین جدایه‌های موجود بودند (شکل ۳).

گروه‌بندی جدایه‌ها در گروه‌های بیماری‌زا

در بین ۱۷ جدایه، واکنش‌های متفاوتی در توانایی بیماری‌زایی بر روی ارقام مختلف مشاهده شد. در بین ارقام مورد استفاده، رقم بین المللی Tetep بیش‌ترین حساسیت را از خود نشان داد در حالی که دو رقم بومی خزر و هاشمی حساسیت کم‌تری نسبت به رقم Tetep داشتند (شکل ۲). محاسبه میانگین طول ناحیه نکروزه جدایه‌ها و آنالیزهای آماری بر روی هر رقم به‌طور جداگانه نیز نشان داد که رقم Tetep به‌طور معناداری حساسیت بیش‌تری نسبت به دو رقم هاشمی و خزر داشت. بر این اساس، میانگین طول ناحیه نکروزه در رقم Tetep به ازای هر جدایه ۵/۷ سانتی‌متر، در رقم هاشمی ۴/۳ سانتی‌متر و در رقم خزر ۳/۹ سانتی‌متر بود. (شکل ۱) علاوه بر این، از مجموع ۱۷ جدایه استفاده شده تعداد ۴ جدایه شامل XoE1، XoE2، XoG3 و XoG2 میانگین طول ناحیه نکروزه‌ای بیش از ۷ سانتی‌متر بر روی رقم Tetep ایجاد کردند، اما در دو رقم دیگر هیچ جدایه‌ای قادر به ایجاد چنین شدتی از علائم نبود. به دلیل حساسیت بالای رقم Tetep، از این رقم در گروه‌بندی جدایه‌ها در گروه‌های بیماری‌زا استفاده شد. بر اساس قدرت بیماری‌زایی و طول ناحیه نکروزه بر روی رقم Tetep، جدایه‌ها به سه گروه بیماری‌زا تقسیم شدند. گروه بیماری‌زای I شامل جدایه‌های با توان بیماری‌زایی بالا بود. میانگین



شکل ۱- میزان حساسیت ارقام استفاده شده به باکتری عامل سوختگی برگ برنج دو هفته پس از مایه زنی. رقم Tetep حساسیت بالاتری نسبت به دو رقم خزر و هاشمی داشت. به دلیل حساسیت بالای رقم Tetep از این رقم جهت گروه‌بندی جدایه‌ها در گروه‌های بیماری‌زا استفاده شد (اعداد پس از \pm انحراف استاندارد می‌باشد).

دهنده تنوع ژنوتیپی بالایی بین جدایه‌های باکتری *X.oryzae* pv.

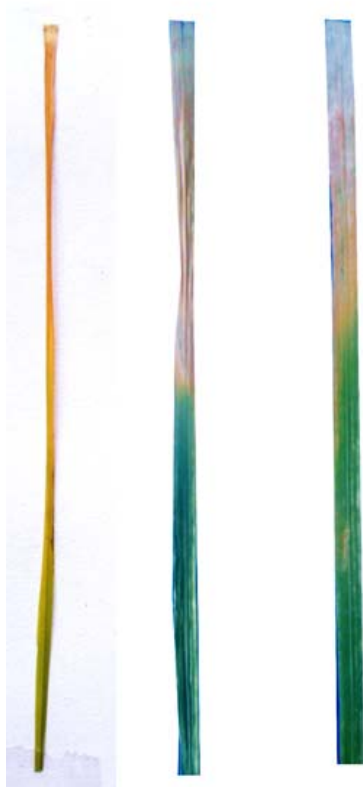
دندروگرام رسم شده بر اساس هر سه آغازگر مورد استفاده، نشان

گرفته است. این که آیا تنوع ژنوتیپی یک عامل بیمارگر با تنوع گروه‌های بیماری‌زای آن دارای رابطه مستقیم است یا خیر می‌تواند به محققین در اتخاذ روش‌های مناسب برای جلوگیری از گسترش عوامل بیماری‌زا کمک کند (۱۴). تغییر و تنوع در گروه‌ها و جمعیت‌های یک بیمارگر می‌تواند به علت تغییرات ژنوتیپی (شامل جهش، نوترکیبی در محتوای ژنومی در پاسخ به تغییر شرایط محیطی یا کشاورزی) و یا مهاجرت از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد. ساختمان تشکیل دهنده یک جمعیت بیمارگر می‌تواند به میزان تنوع ژنوتیپی درون یک جمعیت، ارتباط‌های فیلوژنی درون یا بین گروه‌های جمعیتی و یا تغییرات جزئی در زمان و مکان وابسته باشد (۲۰).
در این بررسی ارتباط ناچیزی بین گروه‌های ژنوتیپی و بیماری‌زا مشاهده گردید. از بین هفت جدایه قرار گرفته در گروه I ژنوتیپی، تنها پنج جدایه $XoA1$ ، $XoA2$ ، $XoA3$ و $XoE1$ و $XoE2$ بودند که در گروه بیماری‌زای I قرار داشتند.

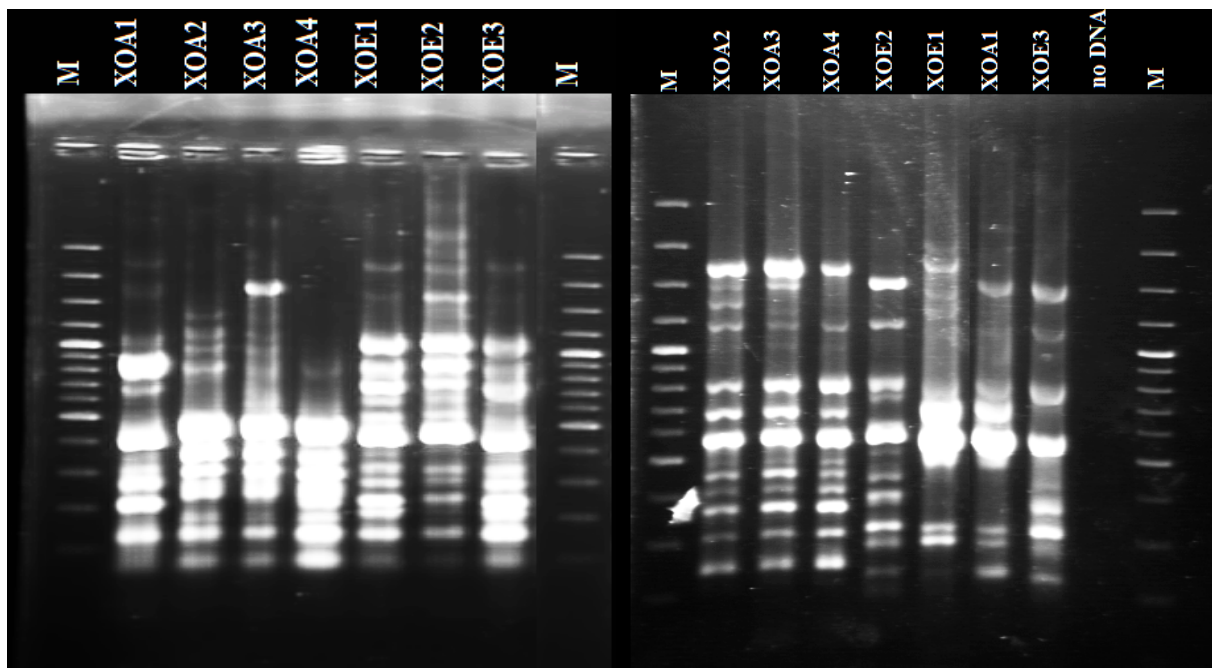
oryzae بود. بر اساس دندروگرام به‌دست آمده جدایه‌ها در سه گروه ژنوتیپی با حداقل شباهت ۶۲ درصد قرار گرفتند. گروه I ژنوتیپی شامل هفت جدایه بود که این جدایه‌ها همگی متعلق به صومعه‌سرا (جدایه‌های XoE) و مؤسسه تحقیقات برنج گیلان (جدایه‌های XoA) بودند. گروه II ژنوتیپی شامل جدایه‌های رشت - سنگر (جدایه‌های XoF) و گروه III نیز شامل جدایه‌های رضوان‌شهر (جدایه‌های XoG) و دابودشت (جدایه‌های XoK) بود. در بین جدایه‌های مناطق مختلف بیش‌ترین شباهت ژنوتیپی بین جدایه‌های دابودشت و رضوان‌شهر مشاهده شد. در جدایه‌های دابودشت شباهت ژنوتیپی در سطح ۱۰۰ درصد مشاهده شد که این شباهت بالای ژنوتیپی در بین این جدایه‌ها می‌تواند به دلیل محدود بودن منطقه نمونه‌برداری این جدایه‌ها باشد (شکل ۴).

بحث

ارتباط بین گروه‌های گروه‌های بیماری‌زا و ژنوتیپی از نظر بیماری‌زایی بر روی عوامل بیماری‌زای مختلفی مورد بررسی قرار



شکل ۲- طول ناحیه نکروزه ایجاد شده توسط جدایه $XoA3$ بر روی رقم Tetep (برگ چپ) رقم هاشمی (برگ میانی) و رقم خزر (برگ راست). علائم ثبت شده دو هفته پس از مایه زنی



شکل ۳- نقوش الکتروفورز محصول PCR توسط آغازگرهای BOXAIR (راست) و ERIC1R/ERIC2 (چپ)

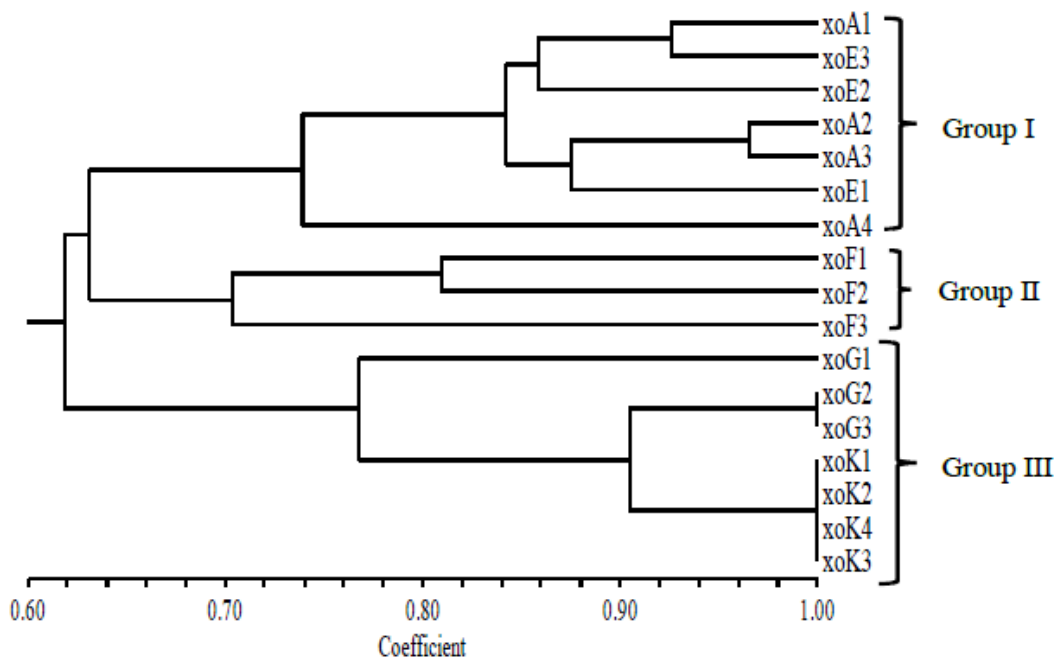
مشاهده کردند. بر اساس مطالعات آن‌ها ارتباط ناچیزی بین گروه‌های بیماریزا و ژنوتیپی وجود داشت. آن‌ها از یازده لاین ایزوژنیک برنج که دارای یک ژن مقاومت بودند استفاده کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که سویه‌های دارای توان بیماری‌زایی مشابه لزوماً دارای شباهت ژنوتیپی بالایی نسبت به یکدیگر نیستند.

اوجیایی و همکاران (۲۰) نیز تنوع ژنوتیپی *X. oryzae* pv. *oryzae* را در بین ۶۰ جدایه موجود با روش RFLP بررسی کردند. جدایه‌ها در ۵ گروه ژنوتیپی قرار گرفتند که هر یک از گروه‌ها ارتباط ناچیزی با شرایط آب و هوای مربوط به محل هر جدایه داشت. آنالیزهای بیماری‌زایی بر روی ۱۱ لاین ایزوژنیک انجام شد و ایزوله‌ها به ۱۴ گروه‌های بیماری‌زایی تقسیم شدند.

سوخویندر و همکاران (۲۵) به بررسی تنوع ژنوتیپی بین ۶۹۳ جدایه در هند با استفاده از روش RADP پرداختند. آنالیزهای داده‌های ژنوتیپی آن‌ها نشان دهنده تنوع ژنوتیپی بالایی بین جدایه‌ها بود، به گونه‌ای که جدایه‌ها در سطح ۷۰ درصد به ۵۱ گروه ژنوتیپی تقسیم شدند. آن‌ها ۱۷ الگوی مختلف (مقاومت و حساسیت) در بین ۱۱ لاین ایزوژنیک مشاهده کردند. لاین‌های با طول ناحیه نکروزه کم‌تر از ۵ سانتی‌متر را به‌عنوان میزبان حساس در نظر گرفتند. بر اساس نظر آنان روش‌های مولکولی ابزار مناسبی برای مطالعه گروه‌های ژنوتیپی مختلف در بین جدایه‌های باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* است، اما این ویژگی‌ها دارای ارتباط پیوسته با خصوصیات بیماری‌زایی بیمارگر نیست.

بین این پنج جدایه شباهت بالای ژنوتیپی در سطح ۸۴ درصد مشاهده شد، این در حالی است که دو جدایه XoG2 و XoG3 در گروه III ژنوتیپی قرار داشتند و شباهت ژنوتیپی این دو جدایه با پنج جدایه ذکر شده تنها در سطح ۶۲ درصد بود. در گروه I ژنوتیپی دو جدایه XoA4 و XOE3 نیز حضور داشتند که این دو جدایه به ترتیب متعلق به گروه‌های بیماری‌زای II و III بودند. در گروه II ژنوتیپی نیز تنها سه جدایه متعلق به رشت- سنگر قرار گرفتند. از این، بین جدایه XoF1 متعلق به گروه بیماری‌زای II و دو جدایه دیگر متعلق به گروه بیماری‌زای III بودند. در گروه III ژنوتیپی نیز سه جدایه XoK1، XoK2 و XoK3 که شباهت ژنوتیپی ۱۰۰ درصد داشتند متعلق به گروه بیماری‌زای III بودند. دو جدایه XoG1 و XoK4 نیز به ترتیب متعلق به گروه بیماری‌زای I و II بودند (شکل ۴).

آدهیکاری و همکاران (۵) تنوع ژنوتیپی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* را در چند کشور آسیایی مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها سویه‌های موجود را در پنج گروه ژنوتیپی جای دادند. فاصله ژنوتیپی درون هر گروه بین ۰/۱۶ تا ۰/۵۱ و فاصله ژنوتیپی بین گروه‌ها از ۰/۴۸ تا ۰/۶۴ متغیر بود. علاوه بر این آن‌ها تنوع میزبانی را در سویه‌های خود مورد بررسی قرار دادند. برای این منظور آنان از ارقام برنجی که دارای ژن‌های مقاومت بودند استفاده کردند. بررسی‌های آنان نشان داد که سویه‌های مختلف باکتری دارای توانایی‌های متفاوتی در بیمار کردن ارقام برنج هستند. آدهیکاری و همکاران (۶) به بررسی تنوع ژنوتیپی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* با استفاده از روش Rep-PCR در نپال پرداختند. آن‌ها تنوع ژنوتیپی بالایی را در بین جدایه‌ها خود



شکل ۴- دندروگرام خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌های *X. oryzae pv. oryzae* بر اساس واکنش rep-PCR رسم شده توسط نرم افزار NtSys pc version 2.02. XoA (جدایه‌های مرکز تحقیقات برنج گیلان)، XoE (جدایه‌های صومعه سرا)، XoF (جدایه‌های رشت) و XoK (جدایه‌های دابودشت) می‌باشند.

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت که باکتری عامل سوختگی برنج دارای تنوع ژنوتیپی بالایی است که این تنوع ژنوتیپی بالا فرآیند ایجاد ارقام مقاوم را برای جلوگیری از گسترش بیماری با مشکل مواجه ساخته است (۱۴). نتایج تحقیقات انجام شده توسط آدهیکاری و همکاران (۵ و ۶)، تاکاهیتو و همکاران (۲۸)، کساوانگ و همکاران (۱۲)، لی و همکاران (۱۵)، ردی و همکاران (۲۲) و اواناسانیا و همکاران (۲۱) مؤید این مطلب است. نتایج حاصل در این مطالعه نیز نشان داد که بین تنوع بیماری‌زایی و ژنوتیپی باکتری *X. oryzae pv. oryzae* ارتباط محدودی وجود دارد.

هو و همکاران (۱۱) نیز تنوع ژنوتیپی باکتری *X. oryzae pv. oryzae* را در بین ۳۲ جدایه با استفاده از روش RFLP و RAPD مورد بررسی قرار دادند. به عقیده آن‌ها باکتری *X. oryzae pv. oryzae* حاوی ژنومی با درصد بالایی از پلی‌مورفیسم ژنوتیپی است که امکان خوبی را برای این بیمارگر در طول ارتباط با میزبان خود فراهم می‌سازد. در ایران نیز طاهری شهرستانی و همکاران (۲۷) تنوع ژنوتیپی را در بین ۶۰ جدایه بومی با روش RAPD مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها جدایه‌های خود را در سطح ۶۰ درصد به سه گروه ژنوتیپی تقسیم کردند.

منابع

- ۱- خشکدامن م، نیک‌نژاد کاظم‌پور م، عبادی ع، پدram فرح. ۱۳۸۸. شناسایی عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج در استان گیلان. حفاظت گیاهان، شماره ۲۳: ۵۷-۵۰.
- ۲- ذاکری ز، اسکندری ف. و زاد ج. ۱۳۶۵. بیماری باکتریایی برنج در استان‌های شمالی ایران. خلاصه مقالات هشتمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۱۰۶.
- ۳- رستمی م، قاسمی ا، رحیمیان ح. و خسروی و. ۱۳۸۹. شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای بذر زاد برنج در استان مازندران. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی. دانشگاه تهران، صفحه ۴۲۰.
- ۴- قاسمی ا، نیک‌نژاد کاظم‌پور م، و پاداشت ف. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای برنج در خزانه‌های استان گیلان. خلاصه مقالات

هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تهران، صفحه ۸۰

- 5- Adhikari T.B., Vera cruz C.M., Zhang Q., Nelson R.J., Skinner D.Z., Mew T.W. and Leach J.E. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. Applied and Environmental Microbiology, 61:966-971.
- 6- Adhikari T.B., Mew T.W., and Leach J.E. 1999. Genotypic and Pathotypic Diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. Phytopathology, 89:687-694.
- 7- Ardales E.Y., Leung H., Vera Cruz C.M., Mew T.W., Leach J.E., and Nelson R.J. 1996. Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse ago ecosystem in the Philippines. Phytopathology, 86:241-252.
- 8- Barker D. 2002. Method for Inoculating Rice with *Xanthomonas*. Plant Pathology Laboratory, Iowa State University. 203 pp.
- 9- Fahy P.C., and Hayward A.C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. pp. 337-347. In: Plant Bacterial Disease: A diagnostic Guide. Fahy, P.C., and Persley, G.J.(eds.) Academic Press Inc, New York.
- 10- Ghosh A., Dey N., Bera A., Tiwari A., Sathyaniranjan K., Chakrabarti K. and Chattopad H. 2010. culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment, India. Saline system, 6:1.
- 11- Hu J., Zhang Y., Qian W. and He C. 2007. Avirulence gene and insertion element-based RFLP as well as RAPD reveal high level of genomic polymorphism in the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Systematic and Applied Microbiology. 30:587-600.
- 12- Kosawang C., Smitamana P., Toojinda T., Nilpanit N., and Sirithunya P. 2006. Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting Differentiates Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Northern Thailand. Phytopathology, 154: 550-555.
- 13- Lee S.W., Han M., Park C.J., Seo Y.S., Bartley L.E., and Jeon J.S. 2001. The Molecular Mechanism of Rice Resistance to the Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Academic Press, 51-78 pp.
- 14- Lee S.W., Han M., Park C.J., Seo Y.S., Bartley L.E. and Jeon J.S. 2011. The Molecular Mechanism of Rice Resistance to the Bacterial Blight Pathogen, *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Advances in Botanical Research, Vol. 60, Burlington, Academic Press: 51-78.
- 15- Li G., Song C.F., Pang X.M., Yang Y., and Wng J.S. 2009. Analysis of Pathotypic and Genotypic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in China. Phytopathology, 157: 208-218
- 16- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., and Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthpmnas* and *Pseudomonas* pathovars and strains Generated with Repetitive Sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60:2286-2295.
- 17- Mew T.W., Alvarez A.M., Leach J.E., and Swings J. 1993. Focus on bacterial blight of rice. Plant Disease, 72:5-12.
- 18- Nelson R.J., Baraoidan M.R., Vera Cruz C.M., Yap I.V., Leach J.E., Mew T.W., and Leungh H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. Applied and Environmental Microbiology, 60:3275-3283.
- 19- Noda O. 1989. A new pathogenic race of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and its inheritance of differential rice variety Tetep to it. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 55:201-207.
- 20- Ochiai H., Horino O., Miyajima K., and Kaku.H. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. Phytopathology, 90:415-421.
- 21- Onasanya A., Onasanya R.O., Abiodun A., and Adewale B.O. 2013. Genetic Analysis and Molecular Identification of Virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolates. ISRN Molecular Biology, 1-8.
- 22- Reddy L.J., Sirisha C., and Sambasiva Rao K.R.S. 2009. Assessment of Genetic and Pathogenic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on High Yielding Local Variety, Tella Hamsa, from Farmer Fields in Gaggillapur and Kompally, Andhra Pradesh. Taiwan, 54: 241-247.
- 23- Schaad N.W., Jones J.B., and Chun C. 2001. Laboratory Guid for identification of plant pathogenic bacteria. (Third edition) St Paul, Minnestota, APS press, 373 pp.
- 24- Shen Y., and Roland P. 2002. Molecular determinant of disease and resistance in interaction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. Microbes Infect, 1361-1367.
- 25- Sukhwinder S., Sodhi M., Vikal Y., Georg M.L.C., Bala G.C., Mangat G.C., Garg M., Sidhu J.S., and Dhalwal H.S. 2003. DNA fingerprinting and virulence analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from Punjab, northern India. Euphytica, 130: 107-115.
- 26- Swing S.J., Van den Moore M., Vauteri L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W., and Kersters K. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1992)sp. nov., non. rev. International Journal of Systematic Bacteriology., 40:309-311.
- 27- Taheri shahrestani M., Niknejad kazempour A., Ebadie A.A., and Elahinia S.A. 2012. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Rice Field of Guilan Province (Iran) Using RAPD Markers. Agriculture Tropical ET Subtropical, 45: 60-65.
- 28- Takahito N., Li C., Li C., Ochiai H., ISE K., and Kaku H. 2001. Pathogenic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Yunnan Province, China. Japan Agriculture Research Quarterly (JARQ), 35(2):97-103.

- 29- Triplett L.R., Hamilton J.P., Buell C.R., Tisserat N.A., Verdier V., Zink F., and Leach J.E. 2011. Genomic analysis of *Xanthomonas oryzae* isolates from rice grown in the United States reveals substantial divergence from known *X. oryzae* pathovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12):3930–3937.