مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۵۷-۵۰

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.50-57

شناسایی عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج در مزارع استان گیلان

مریم خشکدامن[1*] - مصطفی نیک نژاد کاظم پور[2] - علی اکبر عبادی[3] - حسن پدرام فر[4]

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۱۱
تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۲۹

چکیده

بیماری بلایت باکتریایی برنج در اثر باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ایجاد می‌شود و یکی از جدی ترین بیماریهای برنج در جهان، بعد از بیماری بلاست می‌باشد. با توجه به اهمیت این بیماری و خسارت های ناشی از آن، در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵ از مزارع مختلف برنج استان گیلان (رودسر، لنگرود، لاهیجان، رشت، انزلی، فومن، صومعه سرا و رودبار) بازدید بعمل آمد و از بوته های برنج که دارای علایم آبسوختگی و زردی برگ بودند، نمونه برداری انجام شد. جداسازی عامل بیماری روی محیط های کشت YDC و NA حاوی آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) انجام گرفت. پس از ۷۲-۴۸ ساعت پرگنه های بدست آمده در محیط کشت YDCزرد رنگ بودند و روی محیط NA کلنی های گرد، لعابدار و به رنگ زرد ایجاد نمودند. براساس مجموع خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، بیماریزایی، حساسیت به آنتی بیوتیکها و با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی این جدایه ها به عنوان *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* شناسایی شدند. این اولین گزارش از وجود باکتری عامل سوختگی باکتریایی برنج در مزارع استان گیلان می‌باشد.

واژه های کلیدی: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*، برنج، سوختگی باکتریایی، گیلان

مقدمه

بیماری بلایت باکتریایی برنج اولین بار در سال ۱۸۸۴ در جنوب ژاپن دیده شد و به خاطر گسترش زیاد ارقام برنج در سه دهه گذشته به یک بیماری مهم در اکثر کشورهای برنج خیز جهان و به خصوص در کشورهای گرمسیر آسیا تبدیل شد (۲۹). این بیماری بعد از بلاست، دومین بیماری مهم برنج در جهان می‌باشد که در شرایط طبیعی ۱۰ تا ۲۰ درصد و در آلودگی های شدید ۵۰ تا ۷۰ درصد باعث کاهش محصول می‌شود (۲۲). اولین بار عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* از ژاپن گزارش شد (۱۴). سپس بر اساس خصوصیات فنوتیپی، عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج در کشور فیلیپین *X. oryzae* pv. *oryzae* معرفی گردید (۳۱). در ایران مطالعات مختصری در زمینه شناسایی و بررسی این باکتری بیماریزای برنج، صورت گرفته و گزارشات انجام شده حضور باکتری *Xanthomonas* را در بذر برنج تایید می‌نماید (۱). بیماری سوختگی باکتریایی در اثر *X. oryzae* روی ارقام آمل ۱ و آمل ۳ تنها با تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و بدون انجام آزمون های بیماریزایی از بذر برنج گزارش گردید (۲). سپس عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج براساس آزمون های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، بیماریزایی و واکنش زنجیره ای پلی مراز تحت عنوان *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* از خزانه های استان گیلان گزارش نمودند (۳). بیماری دارای سه علایم مشخص سوختگی برگ، پژمردگی یا کرسک و زردی برگ می‌باشد. علایم سوختگی برگ متداولتر می‌باشد ولی در مرحله کرسیک بیشترین خسارت به گیاه وارد می‌شود. در زردی برگ، باکتری در خود برگ وجود ندارد اما در میان گره ها و طوقه گیاهان آلوده دیده می‌شود. علایم بیماری به واریته یا فیزیولوژی گیاه برنج، بیماری زایی بیمارگر و شرایط آب و هوایی بستگی دارد (۲۵). با توجه به اینکه بیماری از نظر کمیت و کیفیت باعث کاهش محصول برنج شده و برنج نیز از محصولات مهم و استراتژیک استان گیلان می‌باشد، این تحقیق به منظور شناسایی عامل بیماری سوختگی باکتریایی برنج در مزارع استان گیلان صورت گرفت.

۱ ، ۲و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
(* - نویسنده مسئول: Email: mkhoshkdaman@yahoo.com)
۳- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵ از مزارع برنج شهرستانهای رودسر، لنگرود، لاهیجان، رشت، انزلی، فومن، صومعه سرا و رودبار بوته هایی که علایم سوختگی، زردی و نکروز برگ را نشان می‌دادند، در مراحل، چهار برگی، پنجه زنی و شکم دهی جمع آوری گردیدند. نمونه ها پس از قرار دادن درون کیسه های پلاستیکی به منظور جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزا به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی عامل بیماری

جداسازی از برگهایی که علایم سوختگی، نکروز و زردی برگ نشان می‌دادند، در سه مرحله انجام شد. هر کدام از این بافت ها ابتدا به طور جداگانه شسته شده، پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ سه بار توسط آب مقطر سترون آبکشی شدند. پس از آن در تشتک پتری سترون حاوی دو میلی لیتر آب پپتونه سترون کاملاً له گردیده و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس از عصاره بدست آمده رقت های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ تهیه شد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط های YDC(Yeast Extract Dextrose Calcium-carbonate) و NA (Nutrient agar) در تشتک پتری پخش شدند. پس از تبخیر آب سطح محیط کشت زیر هود میکروبیولوژیک، تشتک ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگه داری شدند. کلنی های رشد یافته به روش تک کلنی، انتخاب و خالص سازی گردیدند.

آزمون اثبات بیماریزایی

جهت انجام آزمون بیماریزایی از بوته های برنج رقم خزر عاری از آلودگی استفاده شد. پس از انجام آزمون بیماریزایی، بوته ها در محلول یوشیدا و در فایتوترون در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، در ۲۵ درجه سلسیوس روز و ۲۰ درجه سلسیوس شب و رطوبت ۸۰ درصد نگهداری شدند (۳۳). میران ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر, معادل ۰/۳۵ به غلظت تقریبی ۱×۱۰^{۸} سلول باکتری (colony forming unit, cfu) از کشت ۲۴ ساعته باکتری در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس از دو روش برای اثبات بیماریزایی استفاده شد. الف- روش تزریق: (Infilteration): در این روش با استفاده از سرنگ یک میلی لیتری سترون، سوسپانسیون باکتری به داخل غلاف برگ تزریق شد (۲۸). ب- روش برش برگ :(Leaf Clipping). در این روش از قیچی جهت برش استفاده شد. قبل از برش، قیچی در اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شد، سپس به سوسپانسیون باکتری آغشته شد و برش هایی به طول ۱/۵ – ۱ سانتی متر در قسمت های بالایی برگ ایجاد شد (۶ و ۱۵). نمونه های شاهد به هر دو روش به طور جداگانه با آب مقطر سترون تیمار شدند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

تعداد ۴۳ جدایه جمع آوری شده از مزارع مختلف استان گیلان، بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند: آزمون فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت و همکاران (۱۶) و شاد و همکاران (۲۷)، آزمون لوان به روش لیلیوت و استید (۲۰)، هیدرولیز نشاسته و تولید استوئین به روش فهی و هی وارد (۱۰)، آزمون اکسیداز به روش کوواکس (۱۷)، آزمون رشد هوازی/ بی هوازی به روش هیو و ولایفسن (۱۳)، آزمون آرژنین دهیدروژناز به روش تورنلی (۳۲)، آزمون احیاء نیترات به روش لیلوت و استید (۲۰)، آزمون هیدرولیز Tween 80 به روش سییرا (۳۰)، آزمون تعیین تحرک باکتری به روش فهی و پرسلی (۱۱)، آزمون تشکیل هسته یخ و آزمون لسیتیناز به روش فهی و هی وارد (۱۰)، آزمون هیدرولیز اسکولین به روش دای (۹)، انجام گرفت. آزمون پکتیناز، تحمل نمک طعام۳٪، ۵٪ و ۶٪، هیدرولیز ژلاتین، DNase، سیترات، تولید ایندول، تولید رنگدانه فلورسنت، آزمون کاتالاز، فسفاتاز، اوره آز، آزمون Ketoglycosidase، چسبندگی، شیر لیتموس، تولید گاز H_2S از سیستئین، آزمون متیل رد (MR)، حساسیت به نیترات و تولید پیگمان به روش شاد و همکاران (۲۷) انجام گرفت. آزمون توانایی جدایه ها در استفاده از مواد آلی مختلف به عنوان منبع کربن، بر اساس روش شاد و همکاران (۲۷) و با استفاده از محیط پایه آیر و همکاران (یک گرم فسفات آمونیوم، ۰/۲ گرم کلورپتاسیم، ۰/۲گرم سولفات منیزیم، یک میلی لیتر از محلول برم تیمول ۱/۶ درصد، ۱۵ گرم آگار خالص و۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر) انجام گرفت. pH محیط پایه آیر در حدود ۷/۲- ۶/۸ تنظیم شد. جدایه ها به صورت لکه ای در تشتک پتری کشت شدند. تغییر رنگ محیط به عنوان استفاده از منابع کربنی تلقی شد. در این آزمایش همه منابع کربوهیدراتی با استفاده از فیلترهای میکروبیولوژیک (۴۴/. میکرومتر)، سترون شده و به غلظت نهایی ۰/۵ درصد در محیط پایه آیر و همکاران اضافه گردید (۲۷).

آزمون آنتی بیوگرام

حساسیت جدایه‌ها نسبت به ده آنتی بیوتیک مختلف با استفاده ازدیسک‌های تجاری شرکت نددای فن به روش پسالیداس انجام گرفت (۲۴) ابتدا سوسپانسیونی به غلظت تقریبی ۱×۱۰^{۶} cfu/ml از کشت ۲۴ ساعت باکتری تهیه گردید. یکصد میکرولیتر از این سوسپانیون در تشتک پتری حاوی محیط کشت به طور یکنواخت

پخش گردید. پس از خشک شدن کامل سطح محیط کشت، شش دیسک آنتی بیوتیک توسط پنس سترون به فواصل cm ۳-۲ از یکدیگر داخل تشتک پتری قرار داده شد. قطر هاله بازدارندگی پس از ۴۸ الی ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و ثبت گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA جدایه ها به روش CTAB (Cetyl Trimethyl Amoniuum Bromide) انجام شد (۸).

برای این منظور ۱/۵ میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط غذایی NA به مدت پنج دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی: ۲۱/۳۷ گرم در لیتر K_2HPO_4 ، ۲۰ گرم در لیتر CTAB، ۸۷/۶۶ گرم در لیتر NaClبه صورت سوسپانسیون در آمده و در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. مجدداً عمل سانتریفوژ به مدت ده دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و فاز رویی به لوله های جدید منتقل گردید. سپس هم حجم مایع داخل لوله ها مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل(۲۴:۱) به هر نمونه اضافه و سانتریفوژ انجام شد. جهت حذف RNA، سه میکرولیتر از RNase-A (Sigma R-4857) به هر نمونه اضافه شد و نمونه ها یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس هم حجم فاز رویی ایزوپروپانول سرد و ۰/۱ حجم استات سدیم سه مولار در pH ۵/۲، جهت رسوب دادن DNA به هر نمونه اضافه شد. در این مرحله می‌توان کلاف DNA را مشاهده نمود. جهت رسوب DNA عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. رسوب حاصل پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ در معرض هوا خشک شده و سپس در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون، حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- سلسیوس قرار داده شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)

جهت انجام این واکنش از آغازگر اختصاصی XOR و XOF با توالی بازهای آغازگر

XOR: 5- ATGCCGATCACCATGCCGAT- 3
XOF: 5- TGGCCTTGTCGTACGAGCTC-3

استفاده شد(۱۹). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR(ده برابر غلظت)، ۱/۳ میکرو لیتر $MgCL_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۳/۵ میکرو لیترdNTPs (یک میلی مولار)، ۱/۵ میکرو لیتر از هر یک از آغازگرها (۶۰ ng/µl)، ۰/۲میکرو لیتر آنزیم DNA Polymerase *Taq* (پنج واحد در میکرو لیتر)، دو میکرو لیتر DNA (۲۰ ng/µl) و ۱۲/۵ میکرو لیتر آب مقطر دوبار تقطیر انجام شد. سیکل گرمایی شامل شش دقیقه ºC ۹۴ و ۳۷ سیکل شامل ۱۵ ثانیه در ºC۹۴، ۱۵ ثانیه در ºC۶۳ و ۳۰ ثانیه در ºC ۷۲ و در نهایت پنج دقیقه در ºC ۷۲ انجام شد (۱۹). ژل آگارز به روش سامبروک و همکاران (۲۶) تهیه و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، زیر نور ماورائ بنفش (۳۱۲ نانومتر) DNA ژل مرئی شد و با استفاده از دستگاه ژل داک GDS (8000, BioRad. California, USA), از ژل عکسبرداری شد. جدایه مرجع *X. oryzae* pv. *oryzae* (CFBP 2532) ارسالی از مرکز تحقیقات باکتریولوژی آنژه- فرانسه، (Collection Francaise de Bacteries Pathogene) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. تمام باندها که در سطح شاهد مثبت قرار گرفتند به عنوان تیمار مثبت در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

علایم بیماری در مزارع شهرهای استان گیلان بیشتر به صورت لکه های آبسوخته و زردی روی برگها دیده شد.

جداسازی عامل بیماری

پس از ۷۲-۴۸ ساعت در محیط های NA و YDC، کلنی هایی به رنگ زرد روشن به قطر یک تا دو میلی متر مشاخده شدند و روی محیط SPA (آگار غذایی حاوی ۵٪ ساکارز) کلنی ها گرد، محدب و مسطح بوده و تولید لعاب نمودند. در نهایت تعداد ۴۳ جدایه از مزارع برنج استان گیلان جداسازی گردید.

آزمون اثبات بیماریزایی جدایه های مولد سوختگی باکتریایی برنج

در آزمون بیماریزایی این جدایه ها روی بوته های برنج به هر دو روش برش برگ و تزریق در هر دو مرحله گیاهچه ای و قبل از خوشه دهی، در تمام برگ هایی که با سوسپانسیون جدایه ها تیمار شده بودند، به تدریج تا ۱۴ روز لکه های آبسوخته، نقاط نکروز و زردی ایجاد شد. زردی کم کم بخش اعظم برگ را فرا گرفت و برگها در قسمت انتهایی دچار پیچیدگی شدند. درحالی که در برگ های شاهد تیمار شده با آب مقطر هیچ گونه آثار آبسوختگی و زردی مشاهده نشد (شکل ۲). علایم بدست آمده با علایم گزارش شده توسطGoto و بارکر مطابقت داشت (۱۲ و ۶). تمامی جدایه های مورد بررسی در این آزمون هم در برگ و هم روی غلاف برگ قادر به ایجاد لکه های آبسوخته و نقاط نکروز و همچنین زردی برگ بودند. جداسازی باکتری از اندام های مایه زنی شده که علایم زردی و نقاط آبسوخته در آن ها مشاهده شده بود انجام شد و آزمون های کلیدی بیوشیمیایی (آزمون های فوق حساسیت، گرم، کاتالاز، اکسیداز، عدم رشد در شرایط بی هوازی و تولید رنگدانه Xanthomonadin در محیط YDC) برای

شناسایی باکتریهای جداسازی شده صورت گرفت. از کلیه بافت های دارای علایم، مجدداً باکتری های مشابه جدایه مایه زنی شده، جداسازی گردید و بدین ترتیب بیماریزایی جدایه های مورد بررسی روی بوته برنج به اثبات رسید. هیچ تفاوتی بین توسعه و شدت علائم در جدایه های مختلف مشاهده نشد و تقریباً شدت علائم ایجاد شده توسط همه جدایه ها یکسان بود. طبق اظهار نظرآردالس می‌توان نتیجه گرفت که عدم تفاوت، به دلیل عدم تفاوت جغرافیایی بارز و هم به علت عدم تفاوت در قدرت بیماریزایی جدایه ها می‌باشد(۵).

خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

نتایج آزمون های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه ها در جدول ۱ نشان داده شده است. با نتایج بدست آمده در آزمون های فوق حساسیت، گرم، کاتالاز، اکسیداز، پکتیناز، اوره آز و همچنین عدم رشد در شرایط بی هوازی و تولید رنگدانه Xanthomonadin در محیط کشت YDC، باکتری های بدست آمده در جنس *Xanthomonas* قرار داده شدند. نتایج بدست آمده با نتایج تحقیقات کوزاوا و همکاران و ادهیکاری و میو مطابقت داشت (۱۸ و ۴). جهت تمایز باکتری های *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* که از نظر نتایج آزمون های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شباهت زیادی به هم دارند، آزمون های شیر لیتموس، استفاده از نیترات مس و تولید استوئین انجام شد. هیچ یک از جدایه ها قادر به لخته کردن شیر لیتموس و تولید استوئین نبوده، اما در محیط حاوی نیترات مس رشد نمودند. بنابراین کلیه جدایه ها به عنوان *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* شناسایی شدند که با نتایج گزارش شده توسط سوئینگس و همکاران که پنج فاکتور بیوشیمیایی جهت تمایز این دو پاتوار به جز موارد ذکر شده نظیر، آزمون های فنیل آلانین دی آمیلاز و ال آلانین را گزارش نمودند، مطابقت داشت (۳۱). سپس آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای در مورد آنها انجام شد.

جدایه ها از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای به جز حساسیت به بعضی از آنتی بیوتیک ها شباهت زیادی به جدایه مرجع *X. o.* pv. *oryzae* CFBP 2532 داشتند.

آزمون آنتی بیوگرام

آزمون آنتی بیوگرام جهت بررسی حساسیت جدایه های باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف انجام شد. جدایه ها بر اساس قطر هاله ایجاد شده درسه گروه مقاوم (فاقد هاله بازدارندگی)، نیمه حساس (قطر هاله بازدارندگی ۵ تا ۱۰ میلی متر)، حساس (قطر هاله بازدارنده ۵ تا ۱۵ میلی متر) قرار گرفتند. از ۴۳ جدایه بدست آمده، ۳۴ جدایه نسبت به سفالکسین، ریفامپسین و آمپی سیلین مقاوم بودند، اما تمام جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند. تعداد ۳۷ جدایه در برابرآنتی بیوتیک اریترومایسین و استرپتومایسین نیمه حساس بودند و ۲۹ جدایه نیز به کلرامفنیکل، کانامیسین، جنتامیسین و تتراسایکلین حساسیت نشان دادند (۲۳). جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف تفاوت نشان دادند و با توجه به نتایج روبرت و پامیلا می‌توان بیان کرد که اکثر آنتی بیوتیک ها تاثیر چندانی در کنترل بیماری بلایت باکتریایی ندارند (۲۵). با وجود این اکثر جدایه های *X. oryzae* pv. *oryzae* به دست آمده از مزارع استان گیلان، حساسیت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین دارند.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

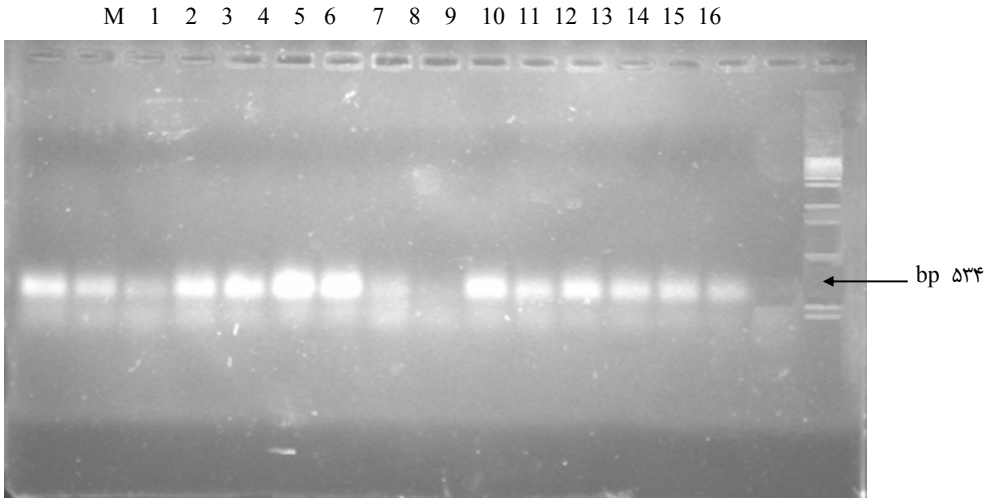
جدایه های تکثیر شده توسط آغازگرهای اختصاصی XOF و XOR و جدایه مرجع که بر اساس خصوصیات افتراقی آزمون های باکتری شناسی به عنوان *X. o.* pv. *oryza* تشخیص داده شده بودند، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، یک باند ۵۳۴bp ایجاد کردند(اندازه مورد انتظار). باند ایجاد شده با شاهد مثبت(جدایه مرجع، *X.* CFBP 2532 *o.* pv. *oryzae*) مطابقت داشت (شکل ۱). این نتایج، نشانه اتصال درست آغازگرها و صحت عمل PCR می‌باشد. طبق اظهار نظر لی و همکاران در آزمایش PCR برای باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* از آغازگرهای XOF وXOR ، که از روی توالی ژن *hpaA* طراحی شده اند استفاده گردید و این یک ابزار مفید جهت شناسایی باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* می‌باشد (۱۹).

از میزان خسارت عامل بیماری هنوزگزارشی دردست نیست، ولی به طور کلی باکتریهای بیماریزای گیاهی روی کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی اثر می‌گذارند. مقاومت میزبان مؤثرترین و اقتصادی ترین روش کنترل بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج می‌باشد (۴). بنابراین اصلاح نژاد برای ایجاد مقاومت مهم می‌باشد، رعایت اصول بهداشتی (۲۱)، استفاده از ترکیبات مسی و مخلوط بردو (۷) نیز در کنترل بیماری مفید خواهد بود.

(جدول۱)- خصوصیات فنوتیپی جدایه های *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* جدا شده از مزارع برنج استان گیلان

ویژگی	واکنش	ویژگی	واکنش
واکنش گرم	–	تولید استوئین	_
رشد هوازی/بی هوازی	هوازی	رشد در ۳۵ درجه	+
تولید لوان	+	تولید هسته یخ	_
اکسیداز	_	Ketoglycosidase	_
لهانیدن سیب زمینی	–	تحرک	+
آرژنین دهیدرولاز	_	تولید متیل رد	_
واکنش فوق حساسیت در توتون	+	تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's	_
هیدرولیز نشاسته	_	آرابینوز	_
هیدرولیز ژلاتین	+	دی سوربیتول	_
هیدرولیز آسکولین	+	ال –رامنوز	_
هیدرولیز توئین ۸۰	+	لاکتوز	_
از سیستئین H_2Sتولید	+	تر هالوز	+
تولید ایندول	_	گالاکتوز	+
احیاء نیترات	_	اینوسیتول	_
لسیتیناز	+	گلوکز	+
اوره آز	_	مالتوز	_
شیر لیتموس	_	سوکروز	+
فعالیت DNase	+	مانیتول	_
تحمل نمک طعام ۳٪	+	سلوبیوز	+
تحمل نمک طعام ۶٪	+	اینولین	_
کاتالاز	+	ریبوز	_
رشد در ۴ درجه (Growth at 4 °c)	+	ملی بیوز	_
تریپتوفان		سیترات	+

– : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت و یا عدم استفاده از ترکیبات + : واکنش مثبت، وجود فعالیت یا استفاده از ترکیبات



(شکل۱)- الکتروفورز محصول PCR جدایه های *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* با استفاده از آغازگرهای XOF / XOR. M نشانگر اندازه (1 kb DNA).

(شکل ۲) – آزمون بیماریزایی جدایه های *X . O.* PV. *Oryzae* روی بوته های برنج (برگ بالایی مایه زنی شده با آب مقطر سترون)

منابع

۱- خوارزمی الف. ۱۳۴۵. بررسی بیماریهای بذرزاد برنج. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران. ۹۹ صفحه.

۲- ذاکری ز.، اسکندری ف. و زاد ج. ۱۳۶۵. بیماری باکتریایی برگ برنج در استانهای شمالی ایران. خلاصه مقالات هشتمین کنگره گیاهپزشکی ایران . دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۱۰۶.

۳- قاسمی ا.، نیک نژاد کاظم پور م. و پاداشت ف. ۱۳۸۵. شناسایی باکتریهای بیماریزای برنج در خزانه های استان گیلان. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. صفحه ۸۰.

4- Adhikari T.B., and Mew T.W. 1994. Resistance of rice to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. Plant Dis. 78: 64-67.

5- 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 bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in philippines. Phytopathology, 86: 241-252.

6- Barker D. 2002. Method for Inoculating rice with *Xanthomonas*. Plant Pathology Laboratory, Iowa State University. 203 pp.

7- Chase A.R., and Broschat T.K.(ads). 1991. Disease and Disorders of Ornamental Palms. APS Press, St. Paul, MN., USA. 56 pp.

8- Cullen D.W., Lees I.K., and Duncan J.M. 2001. Conventional PCR and real time quantative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tuber. Eur. J. Plant Pathol., 107: 387-398.

9- Dye D.W. 1962. the inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. New Zeland J. Sci., 5: 393-416.

10- 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.

11- Fahy P.C., and Persley, G.J. 1983. Plant Bacterial Disease: A diagnostic guide. Academic Press, Inc, New York. 389p.

12- Goto M. 1964. Kreseck and pale yellow leaf, systemic symptom of bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* (Uyeda & Ishiyama) Dowson. Plant Dis. Rep., 48:858-61.

13- Hugh R., and Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative methabolism of

carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacterio., 66:24-26.
14- Ishiyama S. 1922. Studies on bacterial leaf blight of rice(in Japaneas*).* Reporter Agricultural Experiment statio*n* ,45:233-251.
15- Kauffman H.E., Reddy A.R.K., Hsiek, S.P.V., and Marca, S.D. 1973. An improved Teqnique for evaluating resistance of race varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep., 57:537-541.
16- Klement Z., Rudolph K., and Sands D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapset 568pp.
17- Kovacs N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. Nature, 178: 703-708.
18- Kusaba T., Watanabe M., and Tabie H. 1966. Classification of the strains of *Xanthomonas oryzae*(Uyeda et Ishiyama) Dowson on the basis of their virulence against rice plants (in Japanes with English summary). Nogyo Gijustsu Kenkyusho Hokoku, ser. *C* 20:67-83-2.
19- Lee B.M., Young J.P., Dong S.P., Jeong G.K., Hee W.K., Tae H.M., Gil B.L., and Joung, K.A. (2004). PCR based sensitive detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Korean J. Microbio. Biotechnol., 32:256-264.
20- Lelliott, R.A., and Stead, D.E. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. Blackwell Scientific Publication, U.K. 215pp.
21- Mclaughlin, M. 2003. A word or two about gardening. [online] Available: http: //Miami-dade. Ifas.ufl. edu/programs/urban. Hort/publications.
22- Mew, T.W., Vera Cruz., C.M. and Medalla, E.S. 1992. Changes in race frequencies of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to the planting of rice cultivars. Plant Dis., 76, 1029-32.
23- Oluwadare, T.O. and Umechuruba, C.I. 1991. Effect of ten antibiotics on the recovery of seed- born *Pseudomonas syringae pv. syringae* of cowpea, vigna unguiculata(L.) walp var. it 825-2246-4. Hindustan Antibiotics Bullethn, 33: 1-4, 7-13. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. J. Bacterio. 90: 415-421.
24- Psallidas P.G. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. Plant Pathol., 42: 38-363.
25- Robert K.W. and Pamela, S.G. 1992. Compendium of Rice Diseases. American Phytopathological Society. 62pp.
26- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Agaros Gel Electrophoresis. Pp. 6.3 – 6.19. In: Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
27- Schaad N.W., Joneas J.B., and Chun C. 2001. Laboratory Guid for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (Thrid edition) St. Paul, Minnestota, APS Pres, 373 pp.
28- Schaad N.W., Wang, Z.K., Di, W., McBeath, J., Peterson, G.L. and Bond, M.R. 1996. An improved infilteration technique to test the pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice seedling. Seed Sci. Technol, 24:449-456.
29- Shen Y., and Ronald P. 2002. Molecular determinant of disease and resistanse in interaction of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and rice. Microbes Infect., 1361-1367.
30- Sierra G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some abservation on the influence of the contact between calls and fatty substrates. J. Microbiol. Serol., 23:15-22.
31- 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. Int. J. Syst. Bacteriol., 40:309-311.
32- Thornely M.S. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine ,etabolism. J. Appl. Bacteriol., 3:37-52.
33- Yoshida S., Forno D.A., Cock J.H., and Gomez K.A. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. *International Rice Research Institute*, Los Bonos, Loguna, Philippines pp 61-66.

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.50-57

مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۵۷-۵۰

Identification of causal agent of bacterial bight of rice in the fields of Guilan province

M. khoshkdaman[1]* – M. Niknejad kazmpour[2] – A. A. Ebadi[3] – H. Pedramfar[4]

Abstract

Bacterial blight of rice, causes by *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* , is one of the most devastating disease of rice after blast disease. During the spring and summer of 2005-2006 different paddy fields in Guilan province (Roodsar, Langrud, Lahijan, Rasht, Anzali, Fooman, Soomeesara and Roodbar) were surveyed and samples were collected from rices showing blight and yellowing in leaves. The extract from tissues were cultured on NA and YDC media containing cyclohexamide (50 µg/ml). After 48 to 72 hours, bacterial colonies were selected and purified. Bacterial colonies were yellow mucoid and produced xanthomonadin pigment on YDC medium. Strains were gram, pectinase and oxidase negative, aerobic and abel to do hypersensitivity reaction on tobacco leaves. According to morphological, physiological and biochemical characteristics, pathogenicity test, antibiotic sensitivity and PCR method with specific primer pair the isolates were identified as *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. This is the first report of existence of *X. o.* pv. *oryzae* on paddy fields in the Guilan provinc

Key words: *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, Rice, Leaf blight, Guilan

(* - Corresponding author Email: mkhoshkdaman@yahoo.com)
1 ,2,4 – M.Sc. Student, Associate Professor and Lecture respectively, Departement of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan
3- Faculty Member of Center of Rice Research, Rasht - Iran