بررسی وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های اکسیداز مثبت سودوموناس دخیل در پوسیدگی غلاف برنج در استان مازندران با استفاده از 16S rRNA – RFLP*

TAXONOMIC STUDY OF ARGININE DIHYDROLASE, OXIDASE – POSITIVE *Pseudomonas* SPECIES ASSOCIATED WITH SHEATH ROT OF RICE BY RFLP – PCR OF 16S rRNA

اسماعیل صابری[۱]، ناصر صفایی[۱**]، حشمت اله رحیمیان[۲] و مهدی رستمی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۳)

چکیده

به‌منظور شناسایی و بررسی روابط جدایه‌های اکسیداز، آرژنین دی هیدرولاز مثبت جنس سودوموناس دخیل در پوسیدگی غلاف برنج، ۳۵ جدایه جمع‌آوری شده همراه با سه جدایه استاندارد با استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی، بیوشیمیایی و الگوی نقوش پروتیینی مورد ارزیابی قرار گرفتند. براساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های بیوشیمیایی، جدایه‌ها در چهار کلاستر متمایز و دو گروه تک‌عضوی گروه‌بندی شدند. با مقایسه نقوش پروتیینی و هم‌چنین خصوصیات بیماری‌زایی، نوع رقم و محل جغرافیایی جدایه‌های مورد مطالعه، یک یا چند جدایه نماینده از هریک از این کلاسترها انتخاب شدند. جدایه‌های نماینده به همراه سه گونه استاندارد *Pseudomonas fuscovaginae*، *P. marginalis* و *P. fluorescense* با استفاده از PCR – RFLP ژن 16S rRNA مورد مطالعه قرار گرفتند. با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از الگوهای برشی آنزیم‌های محدود شکن این جدایه‌ها در شش خوشه و ژنوتیپ متمایز از هم گروه‌بندی شدند. جدایه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در چهار ژنوتیپ شامل *P. marginalis* و سه ژنوتیپ متمایز از هم و متفاوت از جدایه‌های استاندارد مورد مقایسه قرار گرفتند. هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه دارای ژنوتیپ مشابه جدایه استاندارد *P. fuscovaginae* که یکی از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی و تغییر رنگ دانه می‌باشد، نبودند.

واژه‌های کلیدی: برنج، پوسیدگی باکتریایی غلاف برگ پرچم، 16S rRNA – RFLP

---

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nsafaie@modares.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری

۳. پژوهشگر مؤسسه تحقیقات برنج کشور، آمل

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری پیچیده پوسیدگی غلاف (Sheath Rot Complex) یکی از بیماری‌های برنج است که عموماً با قهوه‌ای شدن یا پوسیدگی غلاف برگ پرچم و تغییر رنگ دانه توصیف می‌گردد. این بیماری در مناطق معتدل و گرمسیر برنج‌خیز دنیا به‌ویژه در مناطقی با بارندگی زیاد که مرحله آبستنی (Booting) و خوشه‌دهی همراه با کاهش دما باشد شایع است و باعث خسارت قابل توجه محصول در این مناطق می‌گردد (Zeigler & Alvarez 1987, Cottyn *et al*. 1996, Jaunet 1996). هر دو عامل قارچی و باکتریایی به‌عنوان عوامل مولد این بیماری معرفی شده‌اند و چون علائم ظاهری ایجاد شده توسط آنها مشابه می‌باشد، تشخیص واقعی تنها براساس علائم مشکل است (Cottyn *et al*. 1996, Naeimi *et al*. 2003). تاکنون باکتری‌های متعددی به‌عنوان عوامل مرتبط با بیماری پیچیده پوسیدگی غلاف گزارش شده‌اند که از این بین جدایه‌های مربوط به گونه‌های اکسیداز آرژنین دی هیدرولاز مثبت سودوموناس به‌عنوان عمده‌ترین عوامل مرتبط با این بیماری هستند (Zeigler & Alvarez 1990, Zeigler *et al*. 1987, Cottyn *et al*. 1996 ab). در مطالعات اولیه بر اساس خصوصیات فنوتیپی، جدایه‌های مشابه با گونه *P. fuscovaginae* به‌عنوان جدایه‌های اکسیداز آرژنین دی هیدرولاز مثبت مرتبط با این بیماری از ایران گزارش شده است (Rostami *et al*. 2004).

در دو دهه گذشته مطالعات تاکسونومی چند مرحله‌ای به‌خصوص با استفاده از آنالیز میکروارگانیسم‌ها در سطح مولکولی نقش مهمی را در اصلاح رده‌بندی سودوموناس‌ها داشته است که از این بین مطالعات بر اساس توالی 16S rRNA بیش از همه مورد توجه بوده است (Young *et al*. 1992, Vandamme *et al*. 1996, Jeng et al. 2001, Palleroni Anzai *et al*. 2000, Kersters *et al*. 1996, Laneet *et al*. 1985, 1993).

RFLP-PCR ژن 16S rRNA به‌عنوان یک روش موفق در تمایز گونه‌های جنس‌های مختلف، به‌خصوص گروه سودوموناس‌های فلورسنت (Laguerre *et al*. 1994) و بررسی فیلوژنی جدایه‌های *P. fuscovaginae* و دیگر سودوموناس‌های فلورسنت‌های همراه با پوسیدگی غلاف برنج به‌کار گرفته شده است (Jaunet *et al*. 1995) . این مطالعه در جهت شناسایی گونه‌های سودوموناس بیماری‌زا و ناشناخته مرتبط با پوسیدگی غلاف و هم‌چنین تعیین وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های نزدیک به گونه *P. fuscovaginae* که در مطالعات اولیه (Rostami *et al*. 2004) ماهیت آنها به‌درستی مشخص نگردیده بود با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی، بیماری‌زایی، الگوی نقوش پروتیینی و نشانگرهای مولکولی شامل آغازگرهای اختصاصی جنس، تجزیه و تحلیل الگوهای PCR – RFLP ژن 16S rRNA انجام گرفته است.

روش بررسی

۱- نمونه برداری و جداسازی

بوته‌های برنج با علایم پوسیدگی غلاف و تغییر رنگ دانه از مزارع شالیکاری استان مازندران در فصل زراعی ۱۳۸۴ جمع‌آوری شد. جداسازی و خالص‌سازی عامل بیماری با استفاده از روش‌های معمول آزمایشگاهی انجام گرفت. برای این منظور قطعاتی به ابعاد ۰/۵ × ۲ تا ۱× ۲ سانتی‌متر از قسمت بین بافت سالم و آلوده جدا و به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در زیر شیر آب و سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. این قطعات توسط هاون چینی استریل کوبیده و در آب مقطر سترون سوسپانسیون شدند. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

Archive of SID

www.SID.ir

مـذکور روی محـیط کـشت کینـگ – ب (KB) در دو تکـرارمخطط و در دمـای ۱ ± ۲۷ درجـه سلیـسیوس نگه‌داری گردیدند. بعـد از ۴۸ سـاعت حـداقل سـه کلنـی متفاوت از لحاظ شـکل ، رنـگ و انـدازه انتخـاب و بـرای خالص‌سازی مجـدد روی محـیط KB مخطـط شـد. بـرای جداسازی عامل بیماری از بذر تعداد ۲۰ عـدد بـذر از هـر یک از نمونه‌ها که دارای علایم تغییر رنگ بودند انتخاب و بعد از شستشوی سطحی به‌مدت ۳۰–۶۰ دقیقه از آنهـا نیـز مانند روش ذکر شده بـرای نمونـه‌هـای غـلاف جداسـازی عامل بیماری انجام شد.

۲- جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه

جدایـه‌هـای باکتریـایی مـورد مطالعـه در ایـن تحقیـق از نمونـه‌هـای جمـع‌آوری شـده در سـال ۱۳۸۴ بـا علائـم پوسـیدگی غـلاف و تغییـر رنـگ دانـه (۱۷ جدایـه)، جدایـه‌هـای جـدا شـده از گیاهچـه بـا علائـم بلایـت (۵ جدایه)، جدایه‌های جدا شده از نمونه‌هـای جمع‌آوری شده از بذر و غلاف‌های آلوده از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ مرکز تحقیقات برنج آمل (۱۳ استرین) و جدایه‌هـای اسـتاندارد *B.* (IBSBF 199).*Burkholderia andropogonis* (IBSBF 1890) *Pseudomonas fuscovaginae gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF 973). *P. fluorescense* و *P. marginalis*،*P. s.* pv. *syringae* (CFBP1655) تهیه شده از کلکسیون‌های IBSBF برزیل، CFBP فرانـسه، آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه علـوم کـشاورزی سـاری و موسـسه تحقیقـات گیـاه‌پزشـکی کـشور، اویـن، تهیـه شد (جدول ۱).

۳- آزمون بیماری‌زایی

آزمـون روی ارقـام بـرنج فجـر در دو مرحلـه آبـستنی (Booting) و گیاهچـه‌ای(۱۵ تـا ۲۰روزه) انجـام گرفـت. آزمون بیماری‌زایی روی گیاهان بالغ در مرحلـه آبـستنی بـا تزریق ۰/۱ میلی‌لیتـر از سوسپانـسیون بـا غلظـت 10^8 cfu درمیلی‌لیتـر از کـشت ۲۴ سـاعته بـاکتری در غـلاف بـرگ پرچم انجام شد. هر جدایه باکتری حداقل روی پـنج پنجـه روی دو بوته مایه‌زنی گردید. برای تیمار شاهد در هر یـک از بوته‌هـا تعـداد یـک یـا دو پنجـه بـا آب مقطـر اسـتریل مایه‌زنی شدند.

آزمون بیمـاری‌زایـی در مرحلـه گیاهچـه‌ای بـا تزریـق 10^8 cfu از سوسپانـــسیون کـــشت ۲۴ ســـاعته بـــاکتری روی گیاهچه‌هـای بـرنج در مرحلـه سـه تـا چهـار برگـی (۱۵ تا ۲۰روزه) انجام گرفت. تزریق در بین غلاف برگ در فاصله ۵ سانتی‌متر بالاتر از سطح گلدان و بـه مقـداری کـه فضای بین غلاف پر گردد (۰/۱ میلـی‌متـر) انجـام گرفـت. حداقل چهار گیاهچه در هر گلدان بـه‌عنـوان چهـار تکـرار برای هر جدایه باکتری و دو گیاهچه برای تیمـار شـاهد در نظر گرفته شد. هر یک از تیمارهای شاهد تنها با آب مقطـر استریل مایه‌زنی شدند. جدایه‌هایی که موجب ایجاد نکـروز حـداقل بـه‌طـول mm ۱۰ در اطـراف محـل تلقـیح شـدند بـــه‌عنـــوان جدایـــه بیمـــاری‌زا در نظـــر گرفتـــه شـــدند (Zeigler & Alvarez 1987, Duveiller *et al*. 1998, Zeigler and Alvarez 1990)

۴- بررسی خـصوصیات بیوشـیمیایی، و فیزیولـوژیکی جدایه‌ها

خصوصیات بیوشیمیایی، و فیزیولوژیکی جدایه‌هـای مـورد مطالعه (۳۰ جدایه) با ۶۵ آزمون (جدول ۲) وبا اسـتفاده از روش‌هـــای اســـتاندارد میکروبیولـــوژی انجـــام شـــد (Schaad *et al*. 2001, Mew and Cottyn 2001).

۵- الکتروفورز پروتیین

مقایسه نقوش پروتیین‌های سلولی جدایه‌ها بـا الکتروفـورز

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. محل جمع‌آوری، مشخصات و وضعیت بیماری‌زایی باکتریایی جدا شده از غلاف برنج

Table 1. Origin, characteristics and pathogencity of bacterial strains isolated from rice sheaths

شماره جدایه (Strain number)	بافت اندام جداسازی شده (Tissue used for isolation)	بیماریزایی روی برنج (pathogenicity on rice)		محل جمع‌آوری شده (Location)
		مرحله گیاهچه ای (seedling stage)	مرحله غلاف (booting stage)	
30, 43	غلاف (sheath)	+	+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
34, 42	غلاف (sheath)	w+	+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
39, 33, 35	غلاف (sheath)	+	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
36	غلاف (sheath)	w+	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
102, 103, 104, 105	غلاف (sheath)	-	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
15, 16, 29	بذر (seed)	+	+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
32	بذر (seed)	w+	w+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
114	بذر (seed)	-	w+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
38	بذر (seed)	+	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
40, 108, 110, 111, 113, 115, 119, 120, 121	بذر (seed)	-	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
123	بذر (seed)	-	-	استان فارس (Fars pro.)
201, 204	گیاهچه(seedling)	+	w+	استان مازندران(Mazandaran pro.)
202, 203, 205	گیاهچه(seedling)	-	-	استان مازندران(Mazandaran pro.)
403	نامشخص(un known)	NT	NT	استان مازندران(Mazandaran pro.)
جدایه‌های استاندارد				
P. fuscovaginae	نامشخص(un known)	NT	NT	IBSBF 973
P. s. pv. syringae	نامشخص(un known)	NT	NT	CFBP(1655)
B. andropogonis	نامشخص(un known)	NT	NT	IBSBF (199)
B. gladioli pv. gladioli	نامشخص(un known)	NT	NT	IBSBF (1890)
P. marginalis	نامشخص(un known)	NT	NT	*
P.fluorescens	نامشخص(un known)	NT	NT	*

+ : بیماری‌زا (virulent)، +W: بیماری‌زایی ضعیف (weakly virulent)، - : غیر بیماری‌زا (avirulent)، NT: مورد آزمون قرار نگرفت (not tested)

*ایزوله‌های موجود در دانشگاه علوم کشاورزی ساری

Strains from culture collection of College of Agriculture, Sari University

مارکر Kb ۱، 1، شاهد منفی، 2، جدایه استاندارد *P. s. pv. syringae*، 3، جدایه استاندارد *P. fuscovaginae*، 4، جدایه استاندارد P. *marginalis*، 5، جدایه ۱۰۴۱، 6، جدایه ۱۱۱، 7، جدایه ۱۱۴، 8، جدایه ۱۵، 9، جدایه ۱۶، 10، جدایه ۳۴ ، 11، جدایه ۳۵، 12، جدایه ۴۲، 13، جدایه ۲۰۱، 14، جدایه استاندارد *B. andropogonis*، 15، جدایه استاندارد *B. gladioli pv. gladioli*، 16، جدایه استاندارد *Acidovorax avenae*

M, Ladder 1 Kb ; 1, Negative; 2, *P. s. pv. syringae* ; 3, *P. fuscovaginae*; 4, *P. marginalis* ; 5 , 104; 6, 111 ; 7, 114; 8, 15 ; 9, 16; 10 , 34 ; 11, 35 ; 12 , 42 ; 13 . 201; 14 , *B. andropogonis* ; 15 , *B. gladioli pv. gladioli* ; 16 , 29 (*Acidovorax avenae*)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از برنج‌های با علائم پوسیدگی باکتریایی غلاف و تغیر رنگ دانه برنج

Table 1. Phenotypic characteristics of bacterial strains isolated from rice with sheath rot and grain discoloration symptoms

خصوصیات (characteristics)	خوشه (Cluster) ×				خصوصیات (characteristics)	خوشه(Cluster)			
	A	B	C	D		A	B	C	D
تولید	+	V	V	+	تولید اسید از : (Acid from)				
2- ketogluconate (Production 2- ketogluconate)									
احیای نیترات (Nitrate reduction)	V	V	V	-	سلوبیوز (Cellobiose)	-	-	+	-
هیدرولیز نشاسته (Starch hydrolysis)	-	-	+	+	لاکتوز (Lactose)	-	-	+	-
ذوب ژلاتین (Gelatin liquefaction)	-	+	+	+	دی – رافینوز (Raffinose)	-	-	V	-
هیدرولیز توئین ۸۰ (Tween 80 hydrolysis)	-	+	+	+	سالیسین (Salicin)	-	-	+	-
هیدرولیز کازئین (Casein hydrolysis)	V	+	+	-	اینوزیتول (Inositol)	-	V	+	-
فسفاتاز (Phosphatase)	V	V	-	+	سوربیتول (Sorbitol)	-	-	+	+
تولید مواد احیاء کننده از سوکروز (Production of reducing substances from sucrose)	-	-	V	-	مانیتول (Mannitol)	-	+	+	+
تولید H2S از سیستئین (H2S from cystein)	-	-	V	V	آدانیتول (Adonitol)	-	V	+	-
تولید H2S از تیو سولفات (H2S from thiosolfate)	-	-	-	+	ال – آرابیتول (L – Arabitol)	-	+	+	+
رشد در کلرید سدیم ۵٪ (Growth in NaCl 5 %)	+	+	-	V	مالتوز (Maltose)	-	-	V	V
هسته یخ (Ice nucleation)	-	V	-	-	اتانول (Ethanol)	V	-	V	+
رشد در C ° ۳۷ (Growth at 37°C)	+	+	V	V	ملی بیوز (Melibiose)	V	V	+	+
رشد در C ° ۴۰ (Growth at 40°C)	V	-	-	-	اریتریتول (Erythritol)	V	-	-	-
تیروزیناز (Tyrosinase)	-	-	V	-	ان – پروپانول (N – Propanol)	V	-	V	+
تولید اسید از : (Acid from)					ژرانیول(Geraniol)	V	-	-	-
ترهالوز(Trehalose)	V	V	+	+	تولید قلیا از: (Alkali from)				
زایلوز (Xylose)	+	-	+	+	مالونات (Malonate)	+	V	+	+
ال – آرابینوز (L – Arabinose)	-	-	+	+	ال –تارتارات (L – Tartrate)	V	V	-	-
ال – رامنوز (L – Rhamnose)	-	-	+	+	بنزوات (Benzoate)	V	-	-	-
سوکروز (Sucrose)	-	V	V	-	اکسالات(Oxalate)	V	V	-	-

* :خوشه‌ها مربوط به دندوگرام ارائه شده در شکل ۱ می‌باشند. ؛ + : ۸۰ درصد از جدایه‌ها یا بیشتر از آن مثبت بودند؛ V : ۲۱ تا ۷۹ درصد از جدایه‌ها مثبت بودند؛ - : ۸۰ درصد از جدایه‌ها یا بیشتر از آن منفی بودند

*: cluster number from numerical analysis of phenotypic data +, 80 % or more strains positive; v, between 21 – 79 % strains positive (numbers in parantheses are percentages of strains that tested positive); -, 80 % or more strains negative

پروتیین در حضور سدیم دود سیل سولفات در سیستم ناپیوسته لملی انجام شد (Vancanneyt *et al*.1996, Zarnowski *et al*. 2001). با مقایسه نقوش پروتیینی و هم‌چنین خصوصیات؛ بیماری‌زایی، نوع رقم میزبان، اندام جداسازی شده و محل جغرافیایی جدایه‌های مورد مطالعه، یک یا چند جدایه نماینده از هریک از این کلاسترها انتخاب شدند. این جدایه‌ها به همراه جدایه ۲۰۴ و جدایه‌های استاندارد

Archive of SID

www.SID.ir

P. fluorescense، *P. marginalis*، *P. fuscovaginae* برای مطالعات ملکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۶- استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی به‌روش *پورتئوس* و همکاران (Porteous *et al*. 2002) روی سوسپانسیون حاصل از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت TSB (tryptic soy broth, Merk) انجام شد.سنجش مقدارو خلوص DNA استخراج شده ژنومی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد.

۷- تشخیص مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای ویژه جنس *Pseudomonas*

تکثیر قطعه ژنومی 16S rRNA اختصاصی جنس سودموناس با استفاده ازآغازگرهای PS-for/ PS-rev به‌روش *ویدمر* و *همکاران* (Widmer *et al* . 1998) انجام شد.

PS-for (5'-GGTCTGAGAGGATGATCAGT-3')
PS-rev (5'-TTAGCTCCACCTCGCGGC-3') واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیترتهیه گردید که اجزای واکنش متشکل از بافر با غلظت یک برابر، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 ، ۰/۲ mM از هر یک ازنوکلئوتیدها ، ۲/۵ واحد از آنزیم پلی مراز(*Taq* DNA Polymerase Cinna Gen) بود.

برنامه تکثیری با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به‌مدت چهار دقیقه و سپس ۳۰ چرخه به‌صورت واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به‌مدت یک دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای ۶۸ °C به‌مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ °C به‌مدت یک دقیقه انجام شد. بسط نهایی در ۷۲°C به‌مدت هفت دقیقه انجام گرفت.

۸- RFLP مبتنی برPCR ژن 16S rRNA

آغازگرهای A1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3') و B6 (5'-TTG CGG GAC TTAACC CAA CAT-3') (ساخت شرکت تولیدی سینا ژن ایران) برای تکثیر ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی به‌کار برده شد (Monceau and Horvais 1997). واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش متشکل از پنج میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر (mM ammonium sulfate ۰/۲۵ mM،۲/۵ mM MgCl2، (۵۰۰ Mm KCl، Tris–HCl (pH ۸/۴)،۲۰۰ از هر یک از نوکلئوتیدها، pmol ۲۰ از هر آغازگر و پنج واحد از آنزیم پلی مراز(*Taq* DNA Polymerase Cinna Gen) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه تکثیری برای آغازگرهای A1/B6 با واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه به‌مدت چهار دقیقه سپس ۳۰ تا ۳۵ سیکل به‌صورت واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به‌مدت یک دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای ۶۰ °C به‌مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ °C به‌مدت یک دقیقه انجام شد. بسط نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت(Monceau & Horvais 1997).

۹- تجزیه و تحلیل محل‌های برش و شبیه سازی الگوهای برشی آنزیم‌های محدود شکن

هضم آنزیمی محصولات PCR **ژن** 16S rRNA با هریک از آنزیم‌های *Taq*1، *Alu*I (Fermentas) و آنزیم‌های *Msp* I، *Hin*dIII ، *Hin*f1 (Takara) براساس توصیه شرکت سازنده آنزیم‌ها انجام شد. محصولات حاصل از هضم آنزیمی هر یک از آنزیم‌ها برای ژن 16S rRNA روی ژل‌های ۱/۵ درصد آگارز در بافر TBE (۰/۱ M ، Boric acid [pH 8] ، ۰/ ۱Tris – MHCl ،۲ mM EDTA) با ولتاژ ثابت ۵ V/cm به‌همراه یک نشانگر اندازه

Archive of SID

www.SID.ir

(Size marker) ۱۰۰ bp الکتروفورز شد. الگوی حاصل از هضم آنزیمی قطعات با استفاده از روش UPGMA و ضریب جاکارد (Jaccard) و با برنامه نرم‌افزاری MVSPمورد آنالیز قرار گرفتند.

نتیجه

نمونه‌های جمع‌آوری شده مبتلا به بیماری پوسیدگی غلاف، طیف وسیعی از علائم را در بذر و غلاف برنج نشان دادند. علائم روی غلاف از نقاط قهوه‌ای تا لکه‌های و یا نوارهای قهوه‌ای و گاهی پوسیدگی کامل غلاف، متغیر بود.

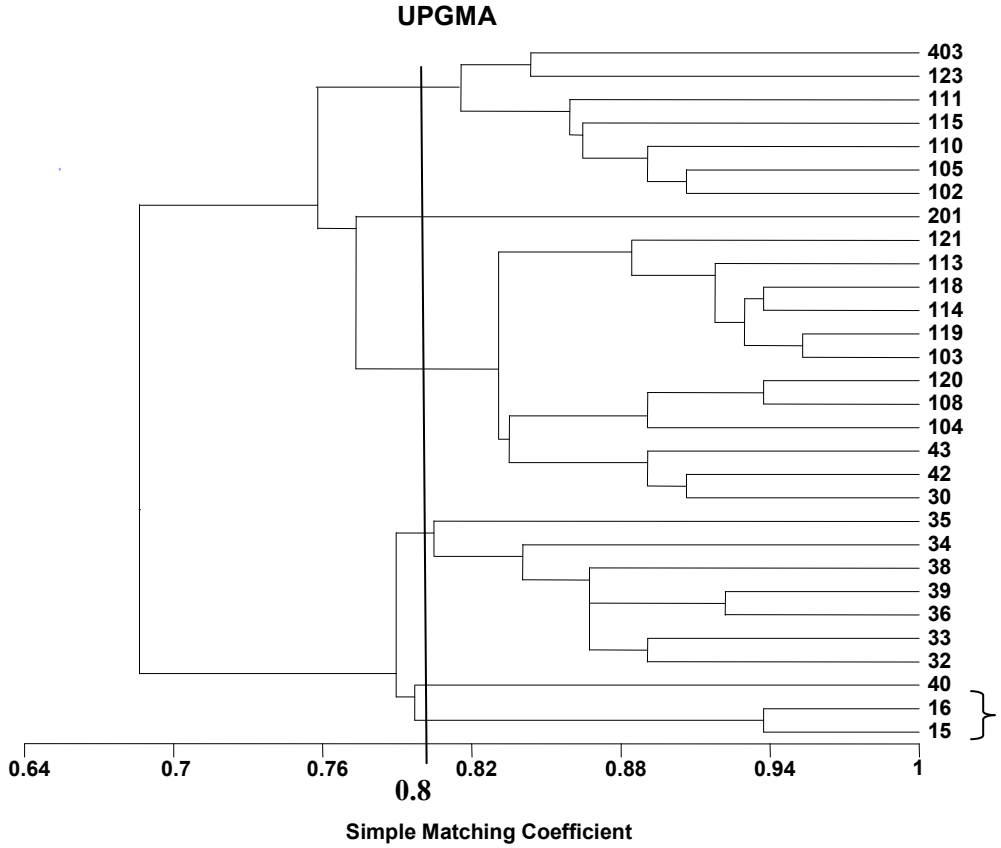
همه جدایه‌های بیماری‌زا در مرحله گیاهچه‌ای بعد از دو تا سه روز در محل مایع‌زنی نقاط آبسوخته ایجاد نمودند که به نوارهای آبسوخته و سپس قهوه‌ای تیره به‌طول پنج تا ۱۰ سانتی‌متر روی غلاف برگ تبدیل شدند. علائم روی غلاف برگ پرچم دو تا سه روز بعد از مایع‌زنی، ابتدا به‌صورت نقاط آبسوخته ظاهر شدند که سپس این لکه‌ها نکروزه شده و به‌صورت نوارهای نکروزه به رنگ خاکستری به طرف بالا و پایین محل مایع‌زنی پیشرفت کردند. این لکه‌ها در صورت شدت آلودگی در تمام طول غلاف گسترش یافتند و به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر رنگ دادند. در مواردی نیز تنها علائم روی غلاف برگ پرچم به‌صورت لکه‌های خاکستری تا قهوه‌ای تیره در محل تلقیح محدود شد جدایه‌هایی که تنها موجب تغییر رنگ بذرها می‌شدند به‌عنوان جدایه‌های با توان بیماری‌زایی ضعیف محسوب شدند. ظهور خوشه‌ها از غلاف‌های آلوده در بیشتر موارد به‌صورت ناقص صورت می‌گرفت. به‌طوری‌که یک سوم تا یک چهارم انتهایی خوشه از غلاف خارج نمی‌شد و محور سنبلچه‌ها رشد ناقص داشتند. خوشه‌های ظاهر شده اغلب دارای سنبلچه‌های پوک بوده و به رنگ خاکستری و یا در صورت شدت آلودگی به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر رنگ دادند. دانه‌ها و غلاف‌های آلوده ده روز بعد ازمایع‌زنی توسعه علائم مورد ارزیابی قرار گرفتند که در اغلب موارد باکتری‌های فلورسنت بیماری‌زا با جمعیت انبوه از بافت‌ها جداسازی شدند.

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از آزمون‌های فنوتیپی با استفاده روش UPGMA و ضریب تشابه ساده (Simple matching) نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه (۳۰ جدایه) در سطح تشابه ۸۰ درصد در چهار خوشه متمایز قرار می‌گیرند که هر کدام دارای حداقل دو عضو می‌باشند. جدایه‌های ۴۰ و ۲۰۱ به‌صورت گروه تک عضوی گروه‌بندی شدند (شکل ۱).

همه خوشه‌ها در آزمون‌های واکنش گرم، فوق حساسیت، تولید لوان، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، هیدرولیز اسکولین، اوره آز، آربوتین، تولید ایندول، رشد در شرایط غیر هوازی، واکنش متیل رد (MR)، VP، رشد در محیط حاوی اینولین و بتاآلانین، تولید اسید از دولیسیتول و مانوز، تولید قلیا از دی – تارتارات، آرژنین و کوییناتِ واکنش منفی داشتند و در آزمون‌های کاتالاز، تولید رنگ‌دانه فلورسنت، کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز آرژنین، رشد در کلرید سدیم ۳٪، استفاده از بتایین و تولید قلیا از استات، مالئات و سیترات واکنش مثبت نشان دادند. خوشه **A** شامل هفت جدایه اکسیداز آرژنین دهیدرولاز مثبت بود که توان بیماری‌زایی روی برنج را نداشتند. مقایسه خصوصیات فنوتیپی این خوشه نشان داد که این خوشه دارای خصوصیات مشابه با گونه *P. putida* بود. اگرچه برخی از جدایه‌های این کلاستر در بعضی از

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. دندوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از برنج‌های با علائم پوسیدگی باکتریایی غلاف و تغیر رنگ‌دانه (مشخصات جدایه ها در جدول ۱ آمده است).

Fig. 1. Dendogram based on cluster analysis of phenotypic data of bacterial strains recovered from rice plants with sheath rot and grain discoloration symptoms (characteristics of strains are shown in Table 1).

آزمون‌ها متفاوت با این گونه بودند و شباهت بیشتری با *P. fluorescens* biov III داشتند. مقایسه نقوش پروتیینی جدایه‌ها این خوشه نشان داد که جدایه‌های ۱۰۲، ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۱، و ۱۱۵ دارای پروفیل کاملاً مشابهی بودند. جدایه‌های ۱۲۳ و ۴۰۳ در فاصله دورتری نسبت به سایر اعضای این خوشه قرار گرفتند و هر کدام دارای الگوی منحصر بفردی بودند. مقایسه نقوش پروتیینی این خوشه با جدایه‌های استاندارد *P. marginalis* و *P. fuscovaginae* نشان داد که هیچ یک از جدایه‌ها با این دو جدایه مشابه نبودند. جدایه ۱۱۱ به‌عنوان جدایه نماینده از این خوشه برای مطالعات مولکولی انتخاب شد.

جدایه‌های خوشه B در سطح تشابه ۸۰ درصد خصوصیات متغیری نشان دادند، به همین دلیل جدایه‌های این خوشه در سطح تشابه بالاتر (۸۴ درصد) مورد مقایسه قرار گرفتند. بر این اساس این خوشه به سه زیرگروه B1 ، B2 و B3 تفکیک شد. مقایسه خصوصیات فنوتیپی زیرگروه B1 نشان داد که از بین استرین‌های اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز مثبت مورد مقایسه بیشترین تشابه را به *P. putida* داشتند هر چند در آزمون هیدرولیز ژلاتین ، لسیتیناز و واکنش فوق حساسیت روی توتون از آن

Archive
www.SID.ir

متفاوت بودند. خصوصیات فنوتیپی زیرگروهB2 نشان داد این زیرگروه تشابه بالایی با *P. fluorescens* biov I دارد. این زیرگروه در خصوصیاتی مانند تولید اسید از قندهای ترهالوز، سوکروز، اینوزیتول، اینوزیتول و آدانیتول از زیرگروه B1 متفاوت بودند. مقایسه نقوش پروتیینی این دو زیرگروه نشان داد که جدایه‌های ۱۱۹، ۱۱۳، ۱۲۱، و ۱۰۳ از زیرگروه B1 دارای نقوش مشابهی بودند در حالی که جدایه‌های ۱۱۴ و ۱۱۸ دارای نقوش مشابه هم و متفاوت از اعضای دیگر بودند هم‌چنین جدایه‌های ۱۲۰، ۱۰۴ و ۱۰۸ (زیرگروه B2) نیز دارای نقوش پروتیینی مشابه هم و متمایز از زیرگروه B1 بودند. همه جدایه‌های مربوط به دو زیرگروه اول (B1 و B2) به‌جز استرین ۱۱۴ روی برنج غیر بیماری‌زا بودند. جدایه ۱۱۴ تنها موجب تغییر رنگ جزیی در دانه‌ها شد. زیرگروه B3 از سه جدایه ۳۰، ۴۲ و۴۳ تشکیل شده که همگی آنها روی برنج بیماری‌زا بودند. مقایسه خصوصیات فنوتیپی این جدایه‌ها نشان داد که آنها خصوصیات متفاوت‌تری از جدایه‌های اکسیداز و آرژنین دهیدرولازمثبت مورد مقایسه بودند. این جدایه‌ها در لهانیدن ورقه سیب زمینی، تولید 2- ketogluconate و عدم تولید اسید از اینوزیتول مشابه *P. fuscovaginae* بودند و از طرفی این جدایه‌ها (زیرگروهB3) در آزمون‌های احیای نیترات، لسیتیناز و رشد در دمای ۳۷ °C ، از آن (*P. fuscovaginae*) متمایز و مشابه *P. marginalis* بودند. این جدایه‌ها در آزمون‌های تولید اسید از سوربیتول، ترهالوز، سوکرز و آدانیتول متغیر بودند. در مجموع جدایه‌های ۱۱۴، ۱۰۴ و ۴۲ به‌عنوان جدایه‌های نماینده از هر یک از این سه زیرگروه (B1 ، B2 و B3) کلاستر B برای مطالعات تکمیلی انتخاب شدند.

جدایه ۴۰ که به لحاظ خصوصیات فنوتیپی در یک گروه تک عضوی گروه‌بندی شده بود، دارای خصوصیت فنوتیپی مشابه با *P. fluorescens* biov III بود. این جدایه روی برنج چه در مرحله گیاهچه‌ای و چه در مرحله غلاف بیماری‌زا نبود.

خوشه C دارای هفت جدایه اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز مثبت می‌باشد که همگی آنها در مرحله گیاهچه‌ای روی برنج بیماری‌زا بودند و تنها جدایه ۳۲ بیماری‌زایی ضعیفی در مرحله غلاف روی برنج داشت. جدایه‌های دیگر این گروه خصوصیت متمایزی از جدایه‌های استاندارد مرتبط با پوسیدگی غلاف نشان دادند. نقوش پروتیینی این جدایه‌ها نشان داد که جدایه ۳۲، ۳۴، ۳۵، و ۳۹ دارای نقوش تقریبا مشابه بودند که از این بین جدایه ۳۵ شباهت بیشتری را به لحاظ خصوصیات فنوتیپی و نقوش پروتیینی با جدایه استاندارد *P. marginalis* نشان داد . جدایه‌های ۳۳، ۳۶ و ۳۸ هر کدام نقوش پروتیینی منحصر به‌فرد و متفاوت از سایر جدایه‌ها داشتند، جدایه‌های ۳۵ و ۳۴ از این کلاستر برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند.

خوشه D دارای دو جدایه ۱۵ و ۱۶ می‌باشد که در فاصله بسیار نزدیکی با گروه تک عضوی ۴۰ گروه‌بندی شده است. جدایه‌های این کلاستر بیماری‌زایی شدیدی را در مرحله غلاف در برنج نشان دادند. مقایسه خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های این کلاستر نشان داد که آنها در آزمون‌های اوره آز، تولید گاز H2S از تیوسولفات، رشد در نمک طعام ۳٪ ، لسیتیناز ، تولید اسید از زایلوز، ملیبیوز و ال- آرابیتول از *P. fuscovaginae* متمایز بودند. این جدایه‌ها در آزمون‌های رشد در ۳۷°C، تولید اسید از مالتوز و ان پروپانول متغیر بودند. مقایسه نقوش پروتیینی این جدایه‌ها نشان داد که آنها دارای نقوش متمایزی از *P. fuscovaginae* بودند. جدایه ۱۶ دارای نقوشی متمایز از

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه ۱۵ و مشابه با *P. marginalis* بود.

آغازگرهای ویژه‌ی جنس سودموناس که بر اساس **ژن** 16S rRNA طراحی شده‌اند، برای تشخیص و متمایز کردن جدایه‌های متعلق به جنس سودموناس از جدایه‌های جنس‌های نزدیک و مرتبط با بیماری پوسیدگی غلاف برنج (*B. gladioli*، *B. glumae*، *Acidovorax avenae*) و هم‌چنین برای ارزیابی جدایه‌های فلورسنتی که دارای خصوصیات فنوتیپی متفاوت از گونه‌های متداول شناخته شده در این جنس بودند، به‌کار گرفته شد. آغازگرهای PS-for/ PS-rev موجب تکثیر قطعه ژنومی به‌طول تقریبی۹۹۰kb برای همه جدایه‌های مورد مطالعه در این بررسی شدند (شکل ۲).

در جدایه‌های استاندارد *B. andropogonis* و *B. gladioli* pv. *gladioli* و جدایه ۲۹ (*Acidovorax avenae*) به‌عنوان اعضای خارج از گروه، هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد. بر این اساس تمامی جدایه‌های مورد مطالعه به‌عنوان اعضای جنس سودوموناس شناخته شدند.

الگوی برش حاصل از محصولات PCR قطعه ژنی 16S rRNA برای بررسی وضعیت تاکسونومی جدایه‌های اکسیداز و آرژنین دهیدولاز مثبت مرتبط با برنج در سطح گونه و هم‌چنین بررسی روابط فیلوژنیتیک بین آنها به‌کار گرفته شد. برای این منظور جدایه‌های نماینده انتخاب شده (۱۳ جدایه) از خوشه‌های A ، B ، C و D با سه جدایه استاندارد *P. fuscovaginae*، *P.marginalis*، *P. fluorescens* مورد مطالعه قرار گرفتند. آغازگرهای A1 و B6 قطعه ژنی مربوط به ناحیه 16S rRNA به‌طول تقریبی 1250bp را در هر یک از جدایه‌های مورد مطالعه تکثیر نمودند.

از بین آنزیم‌های مورد مطالعه، آنزیم‌های برشی *Hin*f I و *Taq*I هر کدام با ۳ الگوی برش بیشترین الگوی برش را در بین جدایه‌های مورد مطالعه ایجاد کردند (شکل ۳).

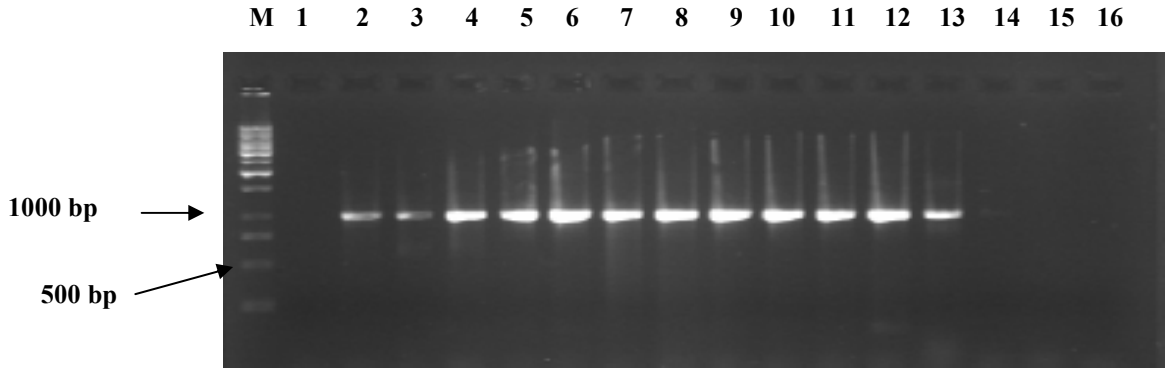
براساس نتایج حاصل از این مطالعات جدایه استاندارد *P. fuscovaginae* در فاصله نسبتاً دوری نسبت به سایر جدایه‌ها در ژنوتیپ **I** قرار می‌گیرد. نزدیک‌ترین ژنوتیپ به آن ژنوتیپ **II است** که تنها بر اساس الگوی برش ایجاد شده توسط آنزیم *Hin*fI (الگوی برش B) از آن متمایز می‌گرد. ژنوتیپ **II** از دو جدایه ۲۰۴ و ۱۵ تشکیل شده است. بر اساس این نتایج جدایه ۲۰۴ جدا شده از گیاهچه‌ها رابطه ژنتیکی نزدیکی با جدایه ۱۵ دارد. ژنوتیپ **III** از سه جدایه نماینده از خوشه‌های A و B تشکیل شده است که بر اساس این مطالعه در یک ژنوتیپ قرار می‌گیرند. نزدیک‌ترین ژنوتیپ‌ها به آنها ژنوتیپ‌های **I** و **II** می‌باشند که در فاصله دوری نسبت به آنها (۶۴ درصد تشابه) قرار دارند که بر اساس الگوی برش منحصر بفرد ایجاد شده توسط آنزیم *Hin*fI (الگوی برش C) از آنها و دیگر ژنوتیپ‌ها متمایز می‌گردند. ژنوتیپ IV حاصل از الگوهای PCR – RFLP شامل جدایه‌های نماینده از دو خوشه متفاوت C و D (۱۶) و جدایه استاندارد *P. marginalis* می‌باشد. ژنوتیپ **V** شامل دو جدایه ۱۰۴ و جدایه استاندارد *P. fluorescens* بود. این خوشه فاصله نزدیکی با خوشه چهار نسبت به سایر خوشه‌ها داشت. جدایه ۲۰۱ به‌عنوان تنها جدایه ژنوتیپ **VI**در فاصله بسیار دور نسبت به سایر جدایه‌ها گروه‌بندی شد. این جدایه بر اساس الگوی برش ایجاد شده توسط آنزیم *Taq*I از سایر جدایه‌ها متمایز می‌گردد (شکل۴ و جدول ۳).

بحث

علائم مشابه با علائم تیپیک پوسیدگی باکتریایی غلاف (bacterial sheath rot) (Ou 1985) و پوسیدگی قهوه‌ای غلاف (Miyajima *et al*. 1983) تنها در موارد معدود و

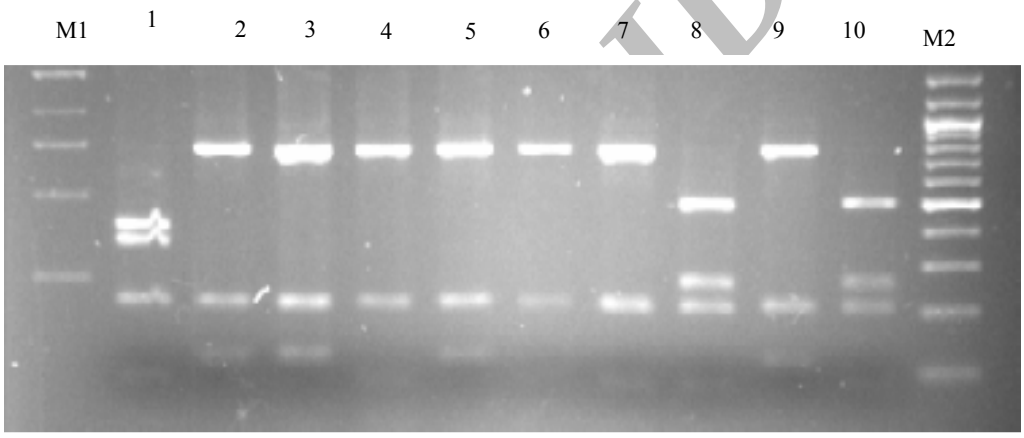
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جدایه‌های مورد مطالعه با آغازگرهای اختصاصی جنس سودوموناس.

Fig. 2. Amplification of specific fragment (990 Kb) using Pseudomonas-selective primers in strains isolated from rice.



شکل۳. الگوهای برش ایجاد شده محصولات PCR قطعه ژنی 16SrRNA با آنزیم برشی *Hin*fI.

.Fig. 3. Electrophoretic patterns of PCR-amplified fragments of 16SrDNA after *Hin*fI digestion

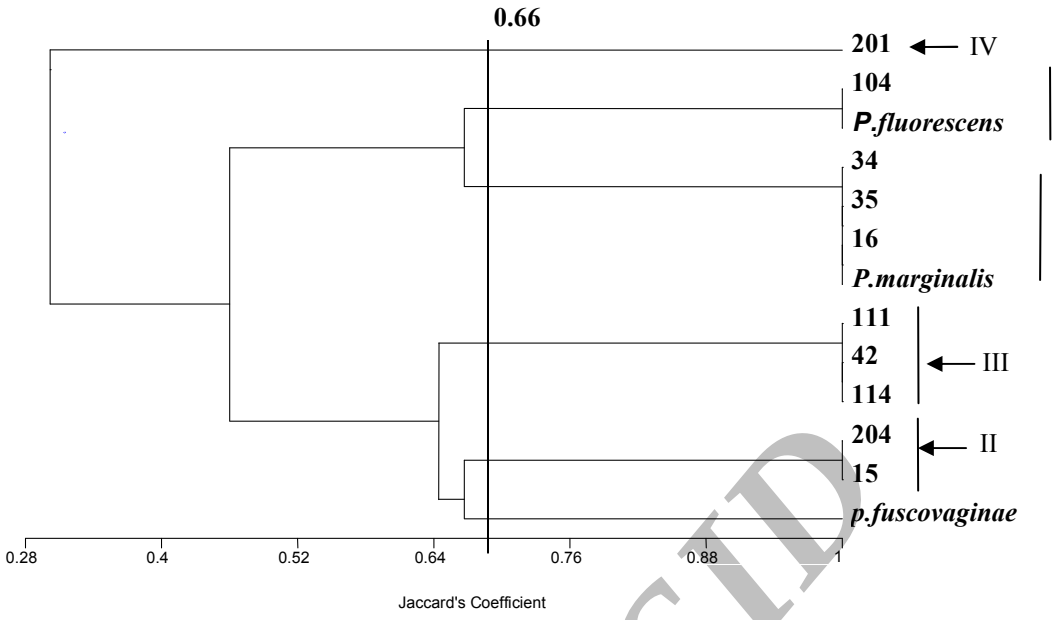
M، مارکر Kb ۱؛ 1، جدایه استاندارد *P. fuscovaginae* ؛ 2، جدایه استاندارد *P. marginalis* ؛ 3، جدایه استاندارد *P. fluorescens*؛ 4، جدایه ۱۵؛ 5، جدایه ۱۶؛ 6، جدایه ۲۰۱؛ 7، جدایه ۲۰۴؛ 8، جدایه ۱۱۴؛ 9، جدایه ۳۵؛ 10، جدایه ۴۲ ؛ M2، مارکر bp ۱۰۰.

M1, ladder 1kb ; 1, *P. fuscovaginae* ; 2, *P. marginalis* ; 3, *P. fluorescens* ; 4, 15 ; 5, 16 ; 6, 201 ; 7, 204; 8,114; 9, .35; 10, 42 ; M2, ladder 100bp

بیشتر در مناطق مرتفع شالیکاری و روی ارقام طارم هاشمی دیده شد.

علائم ایجاد شده در آزمون بیماری‌زایی معمولاً مشابه بود اگرچه شدت علائم در بین جدایه‌های مایه‌زنی شده تفاوت داشت. بر این اساس تعیین اتیولوژی بیماری تنها بر اساس علائم ممکن نیست. براساس مجموعه مطالعات حاصل از خصوصیات فنوتیپی، الکتروفورز پروتیین سلولی و آنالیز الگوهای برش ژن 16S rRNA مشخص شد که عوامل باکتریایی متعددی با بیماری پوسیدگی غلاف در ارتباط هستند و جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به چندین گونه از جنس *Pseudomonas* تعلق دارند. این جنس به‌عنوان یکی از جنس‌های اصلی و متداول دخیل در

www.SID.ir



شکل ۴. دندوگرام حاصل از الگوهای PCR – RFLP قطعه ژنومی 16Sr RNA با پنج آنزیم برشی مورد مطالعه در سه جدایه استاندارد و ۱۰ جدایه منتخب عامل پوسیدگی غلاف برنج (مشخصات جدایه ها در جدول ۱ آمده است).

Fig. 4. Dendrogram based on 16S rRNA – RFLP patterns using five restriction enzymes from three standard strains and ten selected srains isolated from rice sheath rot (characteristics of strains are shown in Table 1).

*** تا VI – ژنوتیپ‌های حاصل از الگوهای PCR – RFLP قطعه ژنومی 16S rRNA با پنج آنزیم برشی مورد مطالعه**

***. Genotypes numbered from I to VI represent the combination of restriction patterns of 16S-rRNA genes digested with five individual restriction enzymes**

جدول۳. ژنوتیپ‌های حاصل از آنالیز برش محصولات PCR ژن 16S rRNA

Table 2. Genotyps determined by analysis of RFLP patterns of amplified 16S-rRNA digested with restriction enzymes

ژنوتیپ * Genotype *	تعداد جدایه No. of strain	الگوهای برش حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR ژن 16SrRNA1 * Restriction patterns of 16S-rDNA digested with enzymes **				
		Taq I	*Hif*I	*Bam*H I	*Msp* I	*Hin*d III
I	1	A	A	A	A	A
II	1	A	B	A	A	A
III	3	A	C	A	A	A
IV	4	B	B	B	A	A
V	2	B	B	A	B	A
VI	1	C	B	A	A	B

*: ژنوتیپ‌های I تا VI نشان‌دهنده مجموعه الگوهای برش حاصل از هر یک آنزیم‌های برشی می‌باشد.

*: Genotypes numbered from I to VI represent the combination of restriction patterns of 16S-rDNA genes digested with five individual restriction enzymes

**: الگوهای برش مشابه ایجاد شده توسط هر یک آنزیم‌ها به‌صورت حروف بزرگ (A – C) مشخص شدند.

**: Groups of similar restriction patterns of each restriction endonucleases are designated by the same uppercase letter (A – C).

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری پوسیدگی غلاف و تغییر رنگ دانه حاصل از عوامل باکتریایی شناخته شده است. این جنس در بردارنده بیشترین و مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی مرتبط با این بیماری که تاکنون شناسایی شده‌اند، می‌باشد (Zeigler *et al.*, 1990, Cottyn *et a*l. 1996) . با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از الگوهای برشی آنزیم‌های برشی جدایه‌های مورد مطالعه در شش کلاستر و ژنوتیپ متمایز از هم گروه‌بندی شدند که از این بین جدایه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در چهار ژنوتیپ شامل ژنوتیپ *P. marginalis* و سه ژنوتیپ متمایز از هم و متفاوت از جدایه‌های استاندارد مورد مقایسه قرار گرفتند. هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه دارای ژنوتیپ مشابه جدایه استاندارد *P. fuscovaginae* نبودند. باکتری *P. fuscovaginae* به‌عنوان یک بیمارگر با پراکنش وسیع در مناطق برنج‌خیز دنیا و به‌عنوان عامل مهم پوسیدگی غلاف و تغییر رنگ دانه (پوسیدگی قهوه‌ای غلاف) شناخته شده است (Zeigler 1990).این گونه با خصوصیات فنوتیپی مشخص و متمایز از دیگر گونه‌ها توصیف شده است (Miya.jima *et al*. 1983) و توسط افراد دیگر نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Duvellier *et al.*1998, Root *et al*. 1991, Zeigler & Alvarez 1990) مطالعات متعدد بعدی با استفاده از خصوصیات فنوتیپی، سرولوژیکی و مولکولی بین جدایه‌های شناخته شده به‌عنوان *P. fuscovaginae* از مناطق مختلف و هم‌چنین جدایه‌ها استاندارد بیانگر تفاوت درون گونه‌ای آن می‌باشد. در این مطالعات مشخص شد که گونه *P. fuscovaginae* یک گونه پلی مورفیک است (Rott *et al*. 1991, Cottyn *et al*. 1996 b, Cottyn *et al.* 2002, Jaunet *el al.* 1995. مقایسه خصوصیات فنوتیپی خوشه D (جدایه ۱۵ و ۱۶)، که در مطالعات اولیه توسط رستمی و *همکاران* به‌عنوان جدایه‌های با خصوصیات مشابه *P. fuscovaginae* شناخته شدند، نشان داد که این کلاستر از نظر هشت خصوصیت کلیدی ذکر شده برای شناسایی و تمایز *P. fuscovaginae* از باکتری‌های اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز مثبت دیگر (Rott *et al*. 1991) آنها در تولید اسید از سوربیتول و تولید 2- ketogluconate از آن متفاوت می‌باشند. مقایسه خصوصیات فنوتیپی بیشتر (۵۵ آزمون) با خصوصیات فنوتیپی استرین تیپ *P. fuscovaginae* (Miyajima *et al*. 1983, Zeigler and Alvarez 1990) نیز تفاوت آنها را از *P. fuscovaginae* نشان داد.

براساس نتایج بررسی‌های فنوتیپی، الکتروفورز پروتیین و الگوهای RFLP قطعه ژنی 16S rRNA مشخص شد که هیچ یک از جدایه‌های مرتبط با پوسیدگی غلاف به‌کار برده شده در این مطالعه در گونه *P. fuscovaginae* قرار نمی‌گیرند.

در مجموع بر اساس خصوصیات فنوتیپی، الکتروفوز پروتیین و الگوهای حاصل از آنزیم‌های برشی جدایه‌های مربوط به کلاستر A (استرین‌های ۱۰۲، ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۵) و زیرگروه B1 (۱۱۴ ، ۱۱۸) دارای روابط نزدیکی با یکدیگر بوده و به‌عنوان یک ژنوتیپ متمایز از دیگر جدایه‌های بررسی شده می‌باشد. اگر چه این خوشه از نظر خصوصیات فنوتیپی در دو گروه مجزا از هم قرار گرفتند، این جدایه‌ها در مقایسه با دیگر جدایه‌ها قرابت فنوتیپی بیشتری را به *P. putida* نشان دادند. جدایه ۴۲ از این ژنوتیپ به‌عنوان جدایه نماینده از خوشه B3 دارای خصوصیات فنوتیپی و نقوش پروتیینی متفاوت از دو جدایه ۱۱۱ و ۱۱۴ و جدایه‌های استاندارد مورد مقایسه می‌باشد. به همین دلیل تعیین دقیق موقعیت تاکسونومیکی آن نیازمند مطالعات بیشتر مانند تعیین توالی ژن‌های اپران ریبوزومی به‌خصوص قطعه ژنی 16S rRNA می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

براساس مجموع خصوصیات فنوتیپی، نقوش پروتیینی و ژنوتیپی جدایه‌های متعلق به زیرگروه B2 به‌عنوان *P. fluorescens* biov I شناخته شدند. این جدایه‌ها به‌عنوان جدایه‌های مرتبط با این بیماری فاقد توان بیماری‌زایی روی برنج می‌باشند.

اگرچه باکتری *P. fluorescens* همانند مطالعات دیگر (Zeigler and Alvarez 1990) به‌عنوان سودوموناس فلورسنت غیر بیماری‌زای متداول همراه با بیماری شناخته شد ولی گزارش‌های متعدد دیگر (Jaunet *el al.* 1995, Cottyn *et al*. 1996 ab, Yuan 2004) مبنی بر وجود جدایه‌های بیماری‌زا با خصوصیات فنوتیپی و یا ژنوتیپی مشابه با *P. fluorescens* ضرورت مطالعه در خصوص تعیین دقیق موقعیت تاکسونومی این جدایه‌ها و هم‌چنین نقش آنها در توسعه بیماری را روشن می‌کند.

براساس مجموع مطالعات انجام شده جدایه‌های متعلق به ژنوتیپ III (جدایه ۱۶ (خوشه D) و جدایه‌های ۳۲، ۳۴، ۳۵، ۳۹ (خوشه C) به‌عنوان جدایه‌های با ژنوتیپ *P. marginalis* شناخته شدند. علی‌رغم گروه‌بندی این جدایه‌ها در خوشه‌های مجزا از هم، مقایسه خصوصیات فنوتیپی این دو خوشه (D و C) نشان داد که این خوشه‌ها روابط نزدیکی نسبت به دیگر خوشه‌ها با یکدیگر دارند و در سطح تشابه ۷۶٪ به همراه گروه تک عضوی جدایه ۴۰ در یک گروه قرار می‌گیرند. مقایسه خصوصیت فنوتیپی این جدایه‌ها نشان داد که این جدایه‌ها دارای خصوصیات بینابینی و متفاوت از جدایه‌های اکسیداز آرژنین و دی‌هیدرولاز مثبت متداول مرتبط با بیماری می‌باشند. در مجموع جدایه‌های نسبت داده شده به ژنوتیپ *P. marginalis* (ژنوتیپ III) در خصوصیات مهمی مانند اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید اسید از مانیتول، سوربیتول و ترهالوز مشابه هم می‌باشند. ولی در خصوصیات مهم دیگر مانند تولید لوان، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، واکنش فوق حساسیت، احیای نیترات و تولید اسید از اینوزیتول و آدونیتول از هم متفاوتند. در هر حال مقایسه نقوش پروتیینی این جدایه‌ها بیانگر تشابه بالای آنها با *P. marginalis* می‌باشد.

در مطالعات متعدد دیگر نیز جدایه‌هایی با ویژگی‌های فوق الذکر گزارش شده، که متمایز از جدایه‌های سودوموناس مرتبط با بیماری پوسیدگی غلاف حاصل از عوامل باکتریایی در نظر گرفته شده‌اند (Cottey *et al*. 1996, Zeigler 1987, Duveiller *et al*. 1998).

جدایه‌های ۲۰۱ و ۲۰۴ از گیاهچه‌های دارای علائم بلایت جداسازی شد. این جدایه‌ها در مرحله گیاهچه‌ای روی برنج بیماری‌زا بودند ولی در مرحله غلاف تنها موجب تغییر رنگ جزیی در خوشه‌ها شدند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، نقوش پروتیینی و ژنوتیپی جدایه ۲۰۱ (ژنوتیپ **VI**) به‌عنوان یک جدایه متفاوت و مجزا از دیگر جدایه‌ها گروه‌بندی شد، هر چند تعیین موقعیت آن نیز نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. جدایه ۲۰۴ به همراه جدایه ۱۵ در یک ژنوتیپ متفاوت از دیگر جدایه‌های مورد مطالعه گروه‌بندی شد.

در مجموع نتایج بررسی حاضر نشان داد که جدایه‌های اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز مثبت متفاوتی از جنس سودوموناس با بیماری کمپلکس پوسیدگی غلاف در ایران در ارتباط هستند که می‌توان هر یک از این گروه از جدایه‌ها را از نظر خصوصیات به گونه‌های مجزا و متفاوت از هم نسبت داد. در مواردی تفاوت‌های جزیی مشاهده شده در بین جدایه‌های بعضی از گروه‌ها در خصوصیات فنوتیپی و یا عدم تطابق بین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی را می‌توان به عللی مانند هتروژنی بالای جدایه‌های منتسب به گونه‌های ناهمگن *P. putida*، *P. marginalis* و

Archive of SID

www.SID.ir

P. fluoresens (Zarrowiski *et al*. 2001, Vacannety *et al*. 1997) و از طرفی وجود جدایه‌های با وضعیت نامشخص تاکسونومی که دارای خصوصیات بینابینی و متفاوت با گونه‌های متداول شناخته شده هستند نسبت داد. با توجه به موارد ذکر شده تعیین دقیق وضعیت تاکسونومی آنها نیازمند مطالعات بیشتر مانند تعیین توالی اپران ریبوزومی می‌باشد.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس منصور بهرامی، مهندس وحید خسروی، مهندس ابوالقاسم قاسمی و خانم‌ها فرشته عربی، حق‌شناس، لیلا زارع و هم‌چنین کارکنان بخش گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات برنج آمل که در انجام این تحقیق صمیمانه همکاری نمودند تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (67-65) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir