

تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Acidovorax oryzae* عامل نوار قهوه‌ای برنج در استان مازندران\*Genetic diversity of strains of *Acidovorax oryzae* causal agent of brown stripe of rice in Mazandaran provinceمائه تقی پور<sup>۱\*</sup>، حشمت‌اله رحیمیان<sup>۱</sup>، ولی‌اله بابایی زاد<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۳)

## چکیده

بیماری نوار قهوه‌ای برنج (brown stripe of rice) یکی از بیماری‌های شایع در خزانه‌های برنج (*Oryza sativa*) می‌باشد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی عامل نوار قهوه‌ای برنج، نمونه برداری، در فصول زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱ از خزانه‌های مازندران انجام شد. عامل بیماری براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (*Acidovorax oryzae*)) تشخیص داده شد. تعداد ۹۰ جدایه مورد بررسیهای فنوتیپی (مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی) و الکتروفورز پروتئین‌های سلولی (SDS-PAGE) قرار گرفتند. از نظر خصوصیات فنوتیپی تنوعی در میان جدایه‌ها مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از آنالیز خوشه‌ای پروتئینی سلولها، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۴۵ درصد به ۲ گروه و در سطح تشابه ۶۸ درصد به ۵ گروه تفکیک کرد. جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، DNA ژنومی جدایه‌ها استخراج و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (rep-PCR) با استفاده از آغازگرهای ERIC و BOX مورد بررسی قرار گرفت. دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی وزن (UPGMA) و با استفاده از نرم افزار NTSYS ترسیم گردید. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده با آغازگر ERIC نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰، ۳۵ و ۶۵ درصد به ترتیب در ۲، ۵ و ۱۰ گروه و با آغازگر BOX در سطح تشابه ۲۰، ۵۰ و ۸۰ به ترتیب به ۷، ۱۶ و ۲۳ گروه دسته بندی شدند. نتایج بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالائی در جمعیت *Ao* عامل نوار قهوه‌ای برنج بود.

کلیدواژه: *Acidovorax oryzae*، تنوع ژنتیکی، rep-PCR، نوار قهوه‌ای برنج

\* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Maedeh.taghipour@gmail.com

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

## مقدمه

طبقه بندی میکروارگانیسم‌ها، وابستگی کمتری به عوامل متغیر و موثر در رشد باکتری داشته، در مدت زمان کوتاه تر و با انعکاس روابط فیلوژنی بین جدایه‌های مختلف، می‌تواند آن‌ها را در گروه‌های خاص قرار دهد. انگشت نگاری ژنتیکی بر اساس repetitive extragenic elements (rep-PCR) روشی معتبر، تکرار پذیر و سریع بوده و از قدرت تفکیک کنندگی بالایی در میان جدایه‌های باکتری‌ها برخوردار است (De Bruijn et al., 1996). سه گروه از توالی‌های تکرار شونده پراکنده در ژنوم باکتری‌ها، که به شکل وسیعی در بررسی تنوع و شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌ها کاربرد داشته و استفاده از آنها رو به فزونی است شامل REP، BOXها و ERIC است. الگوی ژنومی به دست آمده توسط روش REP-PCR، BOX-PCR، REP-PCR و (rep-PCR) (ERIC-PCR) برای جدایه‌ها و پاتوارها، اختصاصی عمل کرده و انگشت نگاری حاصل از rep-PCR ابزار تشخیصی مناسبی به منظور گروه بندی، شناسایی و بررسی سیر تکاملی پاتوارها بوده است (Louws et al., 1994).

عناصر BOX، عناصر درون ژنی مقارن هستند. این عناصر شامل سه زیر واحد به طول‌های ۵۰، ۴۵ و ۵۹ نوکلئوتید بوده و آرایش موزاییکی دارند. (Koeuth et al., 1995) واحد تکراری درون ژنی Enterobacterial (ERIC) repetitive intergenic consensus عنصری با ۱۲۶ جفت باز که شامل یک تکرار معکوس شده مرکزی با حفاظت شدگی بالاست که در نواحی خارج ژنی کروموزومی یا ژنوم‌های باکتری جای گرفته است (Lupski & Weinstock, 1992).

در یک بررسی صورت گرفته روی عوامل نوار قهوه‌ای برنج و بلایت برگی ذرت در شمال کشور جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی متفاوت بوده ولی در نقوش

باکتری *Acidovorax avenae* با ایجاد بیماری‌هایی چون نوار قهوه‌ای برنج (*Oryza sativa* L.) (Bradbury, 1970)، لکه میوه هندوانه (*Citrullus lanatus*) (Schaad & Sumner, 1978)، بلایت برگی ذرت (*Zea mays*) (et al., 1977) و نوار قرمز نیشکر (*Saccharum officinarum*) (Hayward, 1962) و لکه برگی آنتوریوم (*Anthurium andreaum*) (Gardan et al., 2000) در دامنه وسیعی از گیاهان مهم تک لپه و دولپه سبب خسارت‌های اقتصادی می‌شود.

بررسی‌های صورت گرفته بر روی جدایه‌های *Acidovorax avenae* منجر به انتقال جدایه‌های *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* عامل نوار قهوه‌ای برنج، به گونه جدید *Acidovorax oryzae* sp. nov. شده است (Schaad et al., 2008). نوار قهوه‌ای برنج (brown stripe of rice) از بیماری‌های شایع برنج می‌باشد که گیاهچه و گیاهان جوان را در خزانه آلوده می‌کند. علائم این بیماری شامل جلوگیری از جوانه زنی، تولید نوار قهوه‌ای روی برگ و غلاف، خمیدگی غلاف برگ و طویل شدن غیر عادی مزوکوتیل است (Kadota & Ohuchi, 1990).

گونه‌های جنس *Acidovorax* گرم منفی، سلول‌ها مستقیم یا اندکی محدب به طول ۱/۲-۰/۲ \* ۵-۰/۸ میکرومتر بوده، فاقد کپسول و اندوسپور، دارای یک و بندرت ۲ یا ۳ تاژک قطبی می‌باشند. باکتری اکسیداز مثبت بوده ولی فعالیت اوره آز، در بین جدایه‌های آن متفاوت می‌باشد. میزان G + C در DNA گونه‌ها ۶۲-۷۰ مول درصد می‌باشد (Willems et al., 1992).

روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای شناسایی و

همکاران در برگ‌های شمعدانی (Klement *et al.*, 1964) صورت گرفت. آزمون بیماری زایی به روش تزریق سوسپانسیون در بافت گیاهی انجام شد (Rahimian, 1986). از کشت‌های ۲ روزه جدایه‌ها سوسپانسیونی با تراکم  $10^7$  سلول در میلی لیتر (کدوری نوری ۰/۰۱ واحد در  $600$  نانومتر) تهیه و با استفاده از سرنگ به پشت برگ گیاهچه‌های ذرت (*Z. mays*) ارقام C955 و ماکسیما، قیاق (*Sorghum halepense*) و چسبک (*Setaria italica*) تزریق گردید. گلدان‌ها در شرایط گلخانه (دمای  $30^\circ\text{C}$  - 22) نگهداری و علائم بصورت روزانه ارزیابی شدند. گیاهچه‌های شاهد با آب تزریق شده و در شرایط مشابه نگهداری گردیدند.

#### آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیولوژیکی و تغذیه‌ای

آزمون اکسیداز به روش کواکس (Kovacs, 1956)، واکنش گرم، فعالیت کاتالاز، تولید سولفید هیدروژن، تولید آرژنین دی هیدرولاز، هیدرولیز اسکولین، نشاسته، ژلاتین، کازین و توپین ۸۰، آزمون اوره آز، رشد در نمک طعام ۳ و ۴ درصد و آزمون استفاده از برخی منابع هیدروکربنی به روش شاد و همکاران (Schaad *et al.*, 2001) انجام شد.

#### مقایسه الگوی پروتئینی سلول‌ها

جدایه‌ها روی محیط NAS کشت داده شدند و بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیونی از آنها در  $500$  میکرولیتر آب مقطر سترون تهیه گردید. به منظور پاره شدن سلول‌ها،  $0/1$  حجم سوسپانسیون، SDS 10 درصد به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵-۲ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند. به منظور تخریب کامل دیواره سلولی، نمونه‌ها ۵-۲ مرتبه و هر بار به مدت ۵ ثانیه با دستگاه اولترا

الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی تفاوتی نداشتند (Shahrokhi, 1995). رستمی و تقوی نیز با بررسی این عوامل باکتریایی در فارس نتایج مشابهی را گزارش کردند (Rostami & Taghavi, 2001). تحقیق حاضر به منظور بررسی همسانی یا تنوع جمعیت‌های *Ao* در خزانه‌های مناطقی در مازندران با استفاده از نشانگرهای ERIC و BOX صورت پذیرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی و تشخیص

در طی فصول زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱ از خزانه‌های مختلف برنج شهرستان‌های استان مازندران از قبیل فریدونکنار، محمودآباد، سرخرود، آمل، بابلسر، بهنمیر، بابل، قائمشهر، جویبار، ساری، بهشهر و نکا نمونه برداری صورت پذیرفت. پس از بازدید از خزانه‌ها، گیاهچه‌های دارای علائم نوار قهوه‌ای جمع آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی باکتری، ابتدا برگ‌های دارای علائم زیر جریان آب به خوبی شسته شدند، سپس قطعاتی از بافت آلوده توسط تیغ سترون جدا شد و در ۳-۲ میلی لیتر آب مقطر استریل خرد شدند. پس از ۲۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون به دست آمده روی محیط آگار غذایی سوربیتول (NAS) مخطط گردید. تشک‌های پتری کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تک کلونی‌های باکتری غالب در حال رشد از هر پتری انتخاب و به عنوان یک جدایه در محیط NAS کشت شد.

#### آزمون اثبات بیماری زایی

آزمون واکنش فوق حساسیت به روش کلمنت و

جدول ۱. توالی آغازگرهای به کار برده شده برای ارزیابی تنوع جدایه های *Acidovorax oryzae* عامل نوار قهوه ای برنج در واکنش های ERIC-PCR (Schaad *et al.*, 2001) و BOX-PCR.

**Table 1. Nucleotide sequence of the primers used for assessment of genetic diversity of *Acidovorax oryzae* isolates the causal agents of brown stripe of rice in ERIC & BOX-PCR (Schaad *et al.*, 2001)**

آغازگر (Primer)	توالی (Sequence)
ERIC1R	'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3-5'
ERIC2	'AAGTAAACTGGGGTGAGCG-3-5'
BOXA1R	'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3-5'

اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند، لایه روئی به عنوان نمونه حاوی DNA برداشته و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای حصول اطمینان از وجود DNA، 5 میکرولیتر DNA استخراج شده به همراه ۲ میکرولیتر محلول حاوی ۱/۰ درصد برم فنل بلو و ۴۰ درصد گلیسرول، روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

آغازگرهای ERIC1R، ERIC2، BOXA1R (Schaad *et al.*, 2001) از شرکت سیناژن تهران تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرها با افزودن آب دوبار تقطیر استریل به غلظت ۴۰ پیکومول رقیق شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۳ میکرولیتر محلول پایه شامل، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، یک میکرولیتر 2/0 dNTPs میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X PCR)، یک میکرولیتر کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم پلیمرز تک با غلظت ۲/۵ واحد در میکرولیتر به همراه ۲ میکرولیتر از DNA هر جدایه انجام شد.

سونیک کاملاً همگن شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس لایه روئی به عنوان نمونه حاوی پروتئین، برداشته شد و به اندازه نصف حجم نمونه‌ها به آنها گلیسرین اضافه گردید. الکتروفورز پروتئین در ژل پلی اکریل آمید با استفاده از سیستم ناپیوسته لاملی (Laemmli, 1970) انجام پذیرفت. غلظت اکریل آمید در ژل جدا کننده ۱۰ درصد و در ژل متراکم کننده ۵ درصد بود. الکتروفورز در شدت جریان ۱۵ میلی آمپر انجام شد، سپس ژل در محلول ۰/۱ درصد کومازی بلو در مخلوط آب مقطر، متانول، اسیداستیک به ترتیب به نسبت‌های ۵۰:۵۰:۱۰ به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی شد. ژل سپس به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه، در محلول رنگ آمیزی فاقد رنگ کومازی بلو رنگ بری گردیده و در اسید استیک ۷ درصد نگهداری شد (Ausubel *et al.*, 1993).

#### تهیه DNA ژنومی

استخراج DNA از سلول‌ها به روش لیز قلیائی ساده انجام شد (Arabi *et al.*, 2006). جدایه‌ها روی محیط NAS کشت شدند و بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیونی از آنها در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه گردید. مقدار ۵۰-۲۵ میکرولیتر محلول ۵ درصد هیدروکسید پتاسیم به نمونه‌ها

صورت ترکیبی (تجمیعی) نیز انجام شد. برای به دست آمدن یک خوشه بندی بهتر، کارائی روش‌های مختلف تجزیه کلاستر به کمک ضریب همبستگی کوفتیک مورد ارزیابی قرار گرفت (Farris, 1969). در این ارزیابی، ضریب کوفتیک میزان ضرایب تشابه محاسبه شده به وسیله ضرایب جاکارد، دایس و سیمپل مچینگ با استفاده از نرم افزار فوق محاسبه و با یکدیگر مقایسه گردید. روشی که واجد ضریب کوفتیک بالاتری بود، خوشه بندی بهتری را منعکس ساخت.

## نتایج

### خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

در بررسی حاضر ۹۰ جدایه باکتری از گیاهچه‌های دارای علائم نوار قهوه‌ای از خزانه‌های برنج حومه ساری، روی محیط NAS جدا سازی شد. جدایه‌ها بر روی محیط NAS دارای کلنی‌های سفید متمایل به زرد کم‌رنگ (نباتی رنگ)، مدور، برجسته با حاشیه صاف و نیمه شفاف بودند. جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز، کاتالاز و اوره آز مثبت بودند. توانایی تولید هیدروژن سولفید، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز توئین ۸۰ و ذوب ژلاتین را داشته ولی قادر به هیدرولیز اسکولین نبودند. آرژنین دی هیدرولاز تولید نکرده، توانائی رشد روی نمک ۳ درصد ولی نه ۴ درصد را داشتند. جدایه‌ها قادر با استفاده از دی-سوربیتول، مانیتول، زایلوز، دی-گلوکز، دی-ریبوز و دی-تارتاریک اسید بوده ولی توانائی استفاده از سوکروز، ترهالوز، سالیسین، مانوز، اینوزیتول، ال-آرژنین، کاپریک اسید و اسکولین را نداشتند. بر اساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی جدایه‌های مورد بررسی به عنوان *Acidovorax oryzae* (Garrity, 2005) شناسایی شدند.

برنامه دمایی برای انجام واکنش ERIC-PCR و BOX به صورت یک چرخه واسرشته سازی در دمای 94 °C به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ چرخه متشکل از ۱ دقیقه در دمای 94 °C، 1 دقیقه در دمای 52 °C و ۳ دقیقه در دمای 72 °C و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 72 °C انجام شد. محصولات PCR در دمای 20 °C- تا زمان مصرف نگهداری شدند.

### الکتروفورز محصولات PCR

به منظور مشاهده محصولات PCR، 5 میکرولیتر از محصول به همراه ۲ میکرولیتر محلول بارگذاری نمونه حاوی ۴۰ درصد گلیسرول و ۰/۱ درصد برم فنل بلو در چاهک بارگذاری شد. الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و در بافر 1X (TBE) به عنوان بافر تانک انجام پذیرفت. پس از الکتروفورز، ژل با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی و از آن عکس برداری شد.

### آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

پس از به دست آمدن اثر انگشت ژنومی در ERIC-PCR و BOX-PCR نمره دهی بر اساس وجود (نمره یک) و یا عدم وجود (نمره صفر) باندها انجام و داده‌ها به صورت یک ماتریکس وارد نرم افزار Excel شدند. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار NTSYS نسخه ۲/۰۲ ترسیم گردید (Rohlf, 1998). از ضریب تشابه جاکارد برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش میانگین حسابی بدون وزن گروه‌های دوتائی (UPGMA)، جهت ترسیم درخت فیلوژنی و آنالیز خوشه‌ای داده‌ها استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده از سه روش مذکور به



شکل ۱. علائم آب‌سوخستگی (a) و نکروز (b) ظاهر شده روی گیاهچه‌های ذرت مایه زنی شده با یک جدایه *Acidovorax oryzae* به ترتیب ۴ و ۸ روز پس از مایه زنی و نگهداری گیاهان در گلخانه.

**Fig 1. Water-soaked (a) and necrotic stripe (b) produced on corn leaves 4 and 8 days following inoculation, respectively, with a representative isolate of *Acidovorax oryzae*.**

#### بیماری زایی

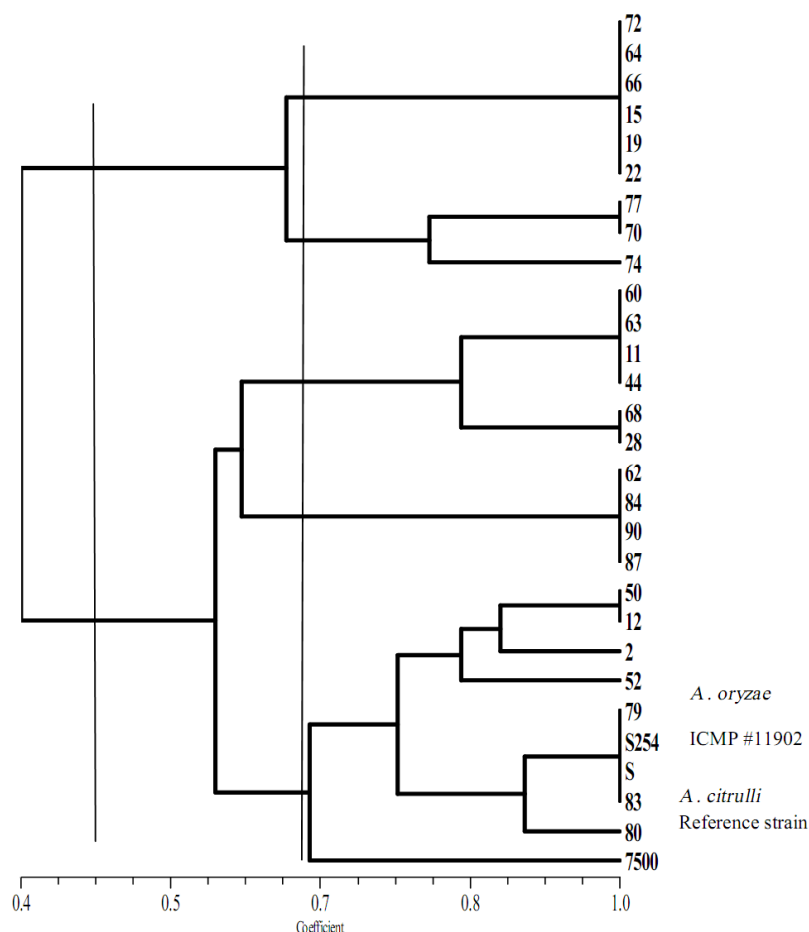
#### تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ERIC و BOX-PCR

اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی حاصل از دو روش ERIC و BOX-PCR مربوط به جدایه‌های مختلف به دست آمد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های به دست آمده، به روش UPGMA انجام شد. ضریب همبستگی کوفنتیک میزان تشابه به دست آمده از طریق ضرایب دایس، جاکارد و سیمپل میچینگ برای آغازگر ERIC به ترتیب ۰/۹۱، ۰/۹۵ و ۰/۸۵ و برای آغازگر BOX به ترتیب ۰/۹۱، ۰/۹۵ و ۰/۸۲ بود. با توجه به اینکه ضریب جاکارد نسبت به ضرایب دیگر از ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتری برخوردار بود؛ برای خوشه بندی بهتر و تعیین میزان تشابه بین جدایه‌ها، از این ضریب استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای داده‌های حاصل از ERIC و BOX-PCR ترسیم گردید و ضریب کوفنتیک آن ۰/۹۲ محاسبه شد. در اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های *Ao* حاصل از ERIC-PCR، تعداد باندهای تکثیر شده بین ۲ تا ۱۲ باند و محدوده اندازه باندها بین

بیماریزائی جدایه‌های نماینده بر روی گیاهچه‌های ذرت (*Z. mays*)، قیاق (*Sorghum halepense*) و چسبک (*Setaria italica*) به اثبات رسید. در ابتدا لکه‌های آب‌سوخسته مشاهده شد که بتدریج از قسمت وسط نکروز شدند. لکه‌ها با گذشت زمان گسترش یافتند و در آخر سبب خشکیدگی برگ شدند (شکل ۱).

#### نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها

نقوش پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها، در ژل پلی‌اکریل آمید شباهت‌های بالائی با یکدیگر داشت. شباهت جدایه‌ها بر اساس وجود و یا عدم وجود باندها محاسبه و دندروگرام بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA ترسیم شد. جدایه‌ها در سطح تشابه ۴۵ درصد به ۲ گروه و در سطح تشابه ۶۸ درصد به ۵ گروه قابل تمایز بودند (شکل ۲).



شکل ۲. دندروگرام نقوش پروتئینی جدایه‌های (*Acidovorax oryzae*) (*Ao*) بدست آمده از گیاهچه‌های برنج خزانه‌های استان مازندران در ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد. دندروگرام با ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA ترسیم شد. شماره‌ها: جدایه‌های *Ao* خزانه‌های استان مازندران. S254: جدایه مرجع (*Ao* 254) ICMP). 7500: جدایه مرجع (*Ao* 11902) ICMP). 7500: جدایه مرجع (*Ac* 7500) ICMP).

**Fig 2. Dendrogram of protein profile of *Acidovorax oryzae* (*Ao*) from rice seedlings in nurseries of the suburb of Sari in 10% polyacrylamide gel. Cluster analysis was performed by using the jacard similarity coefficient and the UPGMA algorithm. The numbers: *Ao* isolaes from Mazandaran. S254: standard isolate *Ao* (ICMP 254). S: standard isolate *Ao* (ICMP 11902). 7500: standard isolate *Ac* (ICMP 7500).**

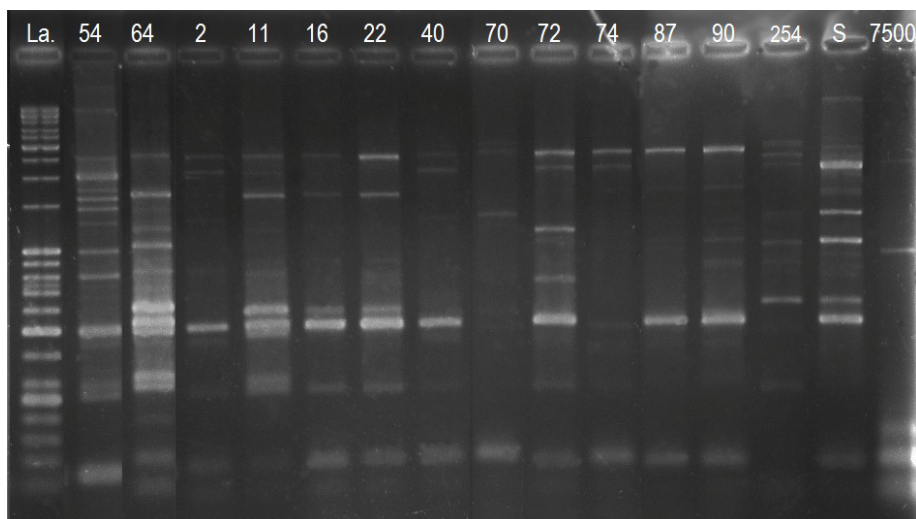
خوشه‌ای نتایج به دست آمده در BOX-PCR جدایه‌ها در سطح تشابه ۸۰، ۵۰ و ۲۰ درصد به ترتیب به ۲۳، ۱۶ و ۷ گروه تقسیم شدند (شکل ۶).

#### آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از دو روش ERIC و BOX-PCR

در تجمیع داده‌های حاصل از PCR با سه آغازگر

۱۵۰ تا ۱ کیلو باز بود (شکل ۳).

در آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده با آغازگر ERIC1R و ERIC2 جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰، ۳۵ و ۶۵ درصد به ترتیب در ۲، ۵ و ۱۰ گروه قرار گرفتند (شکل ۴). در اثر انگشت ژنومی حاصل BOX-PCR (شکل ۵) تعداد باندهای تکثیر شده ۲ تا ۱۰ باند و محدوده باندها بین ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود. در آنالیز



شکل ۳. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های (*Acidovorax oryzae*) (*Ao*) بدست آمده از گیاهچه‌های برنج خزانه‌های استان مازندران با آغازگرهای ERIC 2 و R ERIC 1 بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. شماره‌های ۵۴، ۶۴، ۲، ۱۱، ۱۶، ۲۲، ۴۰، ۷۰، ۷۲، ۷۴، ۸۷، ۹۰ = جدایه‌های *Ao* خزانه‌های استان مازندران. S254 = جدایه مرجع S. (ICMP) 254 = *Ao* = جدایه مرجع 7500 (ICMP) 11902 = *Ao* = جدایه مرجع La (ICMP) 7500 = *Ac* = نشانگر جرم مولکولی kbp1

**Fig 3 . Genomic fingerprints of *Acidovorax oryzae* (*Ao*) strains leaves seedling of rice from nurseries in the suburb of Sari. isolates generated from ERIC-PCR with ERIC1R and ERIC2 primers in 1.2% agarose gel. 54, 64, 2, 11, 16, 22, 40, 70, 72, 74, 87, 90 : *Ao* isolates from Mazandaran. 254: standard isolate *Ao* (ICMP 254). S: standard isolate *Ao* (ICMP 11902). 7500: standard isolate *Ac* (ICMP 7500). La: Marker (1kbp ladder, Fermentas).**

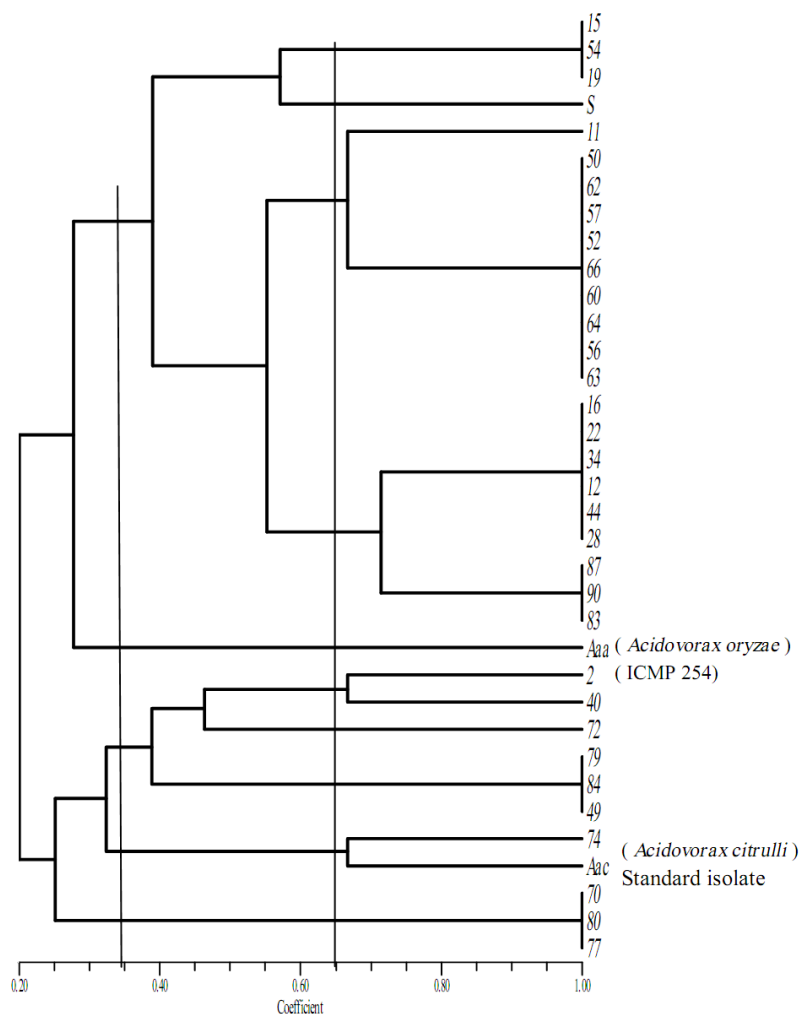
جدایه‌های *Ao* مورد بررسی دارای خصوصیات فنوتیپی (بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) مشابهی بودند و تنوعی در میان جدایه‌ها مشاهده نشد، در حالیکه شاهرخی (Shahrokhi, 1995) و رستمی و تقوی (Rostami & Taghavi, 2001) در بررسی‌های خود، به وجود تفاوت‌های فنوتیپی در میان جدایه‌های مورد بررسی اشاره داشتند. در بررسی رستمی و تقوی (Rostami & Taghavi, 2001) و شاد و همکاران (Schaad et al., 2008) جدایه‌های به دست آمده از برنج توانائی بیماریزائی بر روی ذرت را داشته اند. در این بررسی نیز بیماریزائی جدایه‌های برنج بر روی ذرت، سورگوم و چسبک به اثبات رسید که شاهرخی (Shahrokhi, 1995) نیز به نتایج مشابهی دست یافته بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که واکنش تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در

۱ ERIC R، ERIC 2 و BOX A1R جدایه‌ها در سطح ۲۰ و ۵۰ درصد به ترتیب به ۴ و ۱۶ گروه دسته بندی شدند؛ جدایه استاندارد *Acidovorax citrullii* (*Ac*) در گروه جداگانه‌ای در کنار سایر جدایه‌ها قرار گرفت (شکل ۷).

## بحث

با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها به عنوان *Acidovorax oryzae* شناسائی شدند؛ که با توصیف‌های رحیمیان (Rahimian, 1986) و ویلمز و همکاران (Willems et al., 1992) در شناسائی این زیر گونه مطابقت داشت. جدایه‌های مورد مطالعه بر خلاف نتایج بررسی‌های گاردان و همکاران (Gardan et al., 2000) توانائی استفاده از ال-آرژنین را نداشتند.



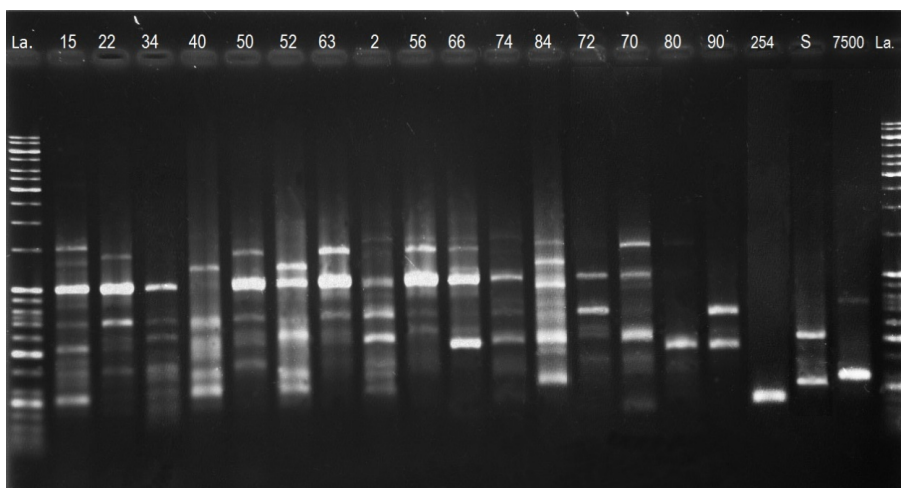


شکل ۴. دندروگرام اثر انگشت جدایه‌ها در آزمون ERIC-PCR جدایه‌های شماره ۱۵، ۱۹، ۱۱، ۵۰، ۶۲، ۵۷، ۵۲، ۶۶، ۶۰، ۶۴، ۵۶، ۶۳، ۱۶، ۲۲، ۳۴، ۱۲، ۴۴، ۲۸، ۸۷، ۹۰، ۸۳، ۲، ۴۰، ۷۲، ۷۹، ۸۴، ۴۹، ۷۴، ۷۰، ۸۰، ۷۷: جدایه‌های *Acidovorax oryzae* (Ao) از خزانه‌های برنج حومه ساری. Aaa: جدایه مرجع S. (ICMP 254) Ao: جدایه مرجع Aac. (ICMP 7500) Ac: جدایه مرجع Aac. تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شد.

Fig 4. Dendrogram of fingerprint pattern of *Acidovorax* isolates in ERIC-PCR. 15, 54, 19, 11, 50, 62, 57, 52, 66, 60, 64, 56, 63, 16, 22, 34, 12, 44, 28, 87, 90, 83, 2, 40, 72, 79, 84, 49, 74, 70, 80, 77: *Acidovorax oryzae* (Ao) from Sari nurseries. Aaa: standard isolate Ao (ICMP 254). S: standard isolate Ao (ICMP 11902). Aac= standard isolate Ac (ICMP 7500). Cluster analysis was performed by using the jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm.

الگوی پروتئین‌های سلولی تعداد زیادی از جدایه‌ها بسیار مشابه بود. شباهت الگوی پروتئینی جدایه‌های مختلف عامل نوار قهوه‌ای برنج در بررسی رستمی و تقوی (Rostami & Taghavi, 2001) و شاهرخی و رحیمیان نیز گزارش شده بود. به نظر می‌رسد روش مذکور کارایی

آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مشابه یکدیگر بودند. جدایه‌های مورد بررسی از لحاظ الگوی پروتئین‌های سلولی در سطح تشابه ۴۵ درصد به دو گروه و هر گروه به چندین زیر گروه قابل تمایز بودند. معه‌ذا تفاوت کمی در الگوی پروتئینی جدایه‌ها وجود داشت و

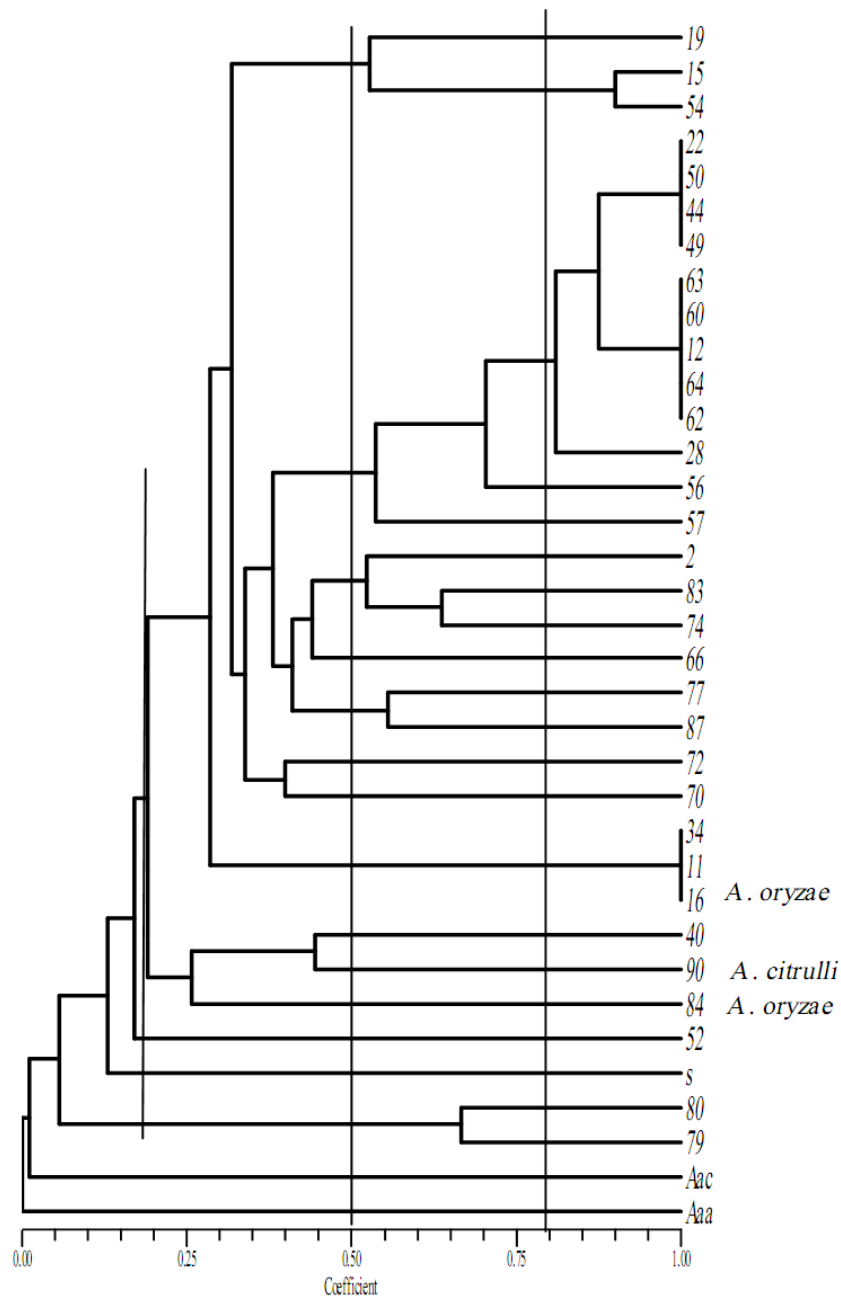


شکل ۵. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های (*Acidovorax oryzae*) (*Ao*) بدست آمده از گیاهچه‌های برنج خزانه‌های ساری با آغازگر BOX A1R بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. شماره‌های ۱۵، ۲۲، ۳۴، ۴۰، ۵۰، ۵۲، ۶۳، ۲، ۵۶، ۶۶، ۷۴، ۸۴، ۷۲، ۷۰، ۸۰، ۹۰= جدایه‌های *Ao* خزانه‌های استان مازندران. ۲۵۴: جدایه مرجع S. (*Ao* 254) ICMP). جدایه مرجع 7500. (*Ao* 11902) ICMP). جدایه مرجع (*Ac* 7500) ICMP. La : نشانگر جرم مولکولی kbp1

**Fig 5. Genomic fingerprints of *Acidovorax oryzae* (*Ao*) isolates from rice seedlings of rice nurseries in Sari, Mazandaran. isolates generated from BOX-PCR with BOX A1R primer in 1.2% agarose gel. 15, 22, 34, 40, 50, 52, 63, 2, 56, 66, 74M 84, 72, 70, 80, 90 local isolates: *Ao* isolates from Mazandaran. 254: standard isolate *Ao* (ICMP 254). S: standard isolate *Ao* (ICMP 11902). 7500: standard isolate *Ac* (ICMP 7500). La: Marker (1kbp ladder, Fermentas).**

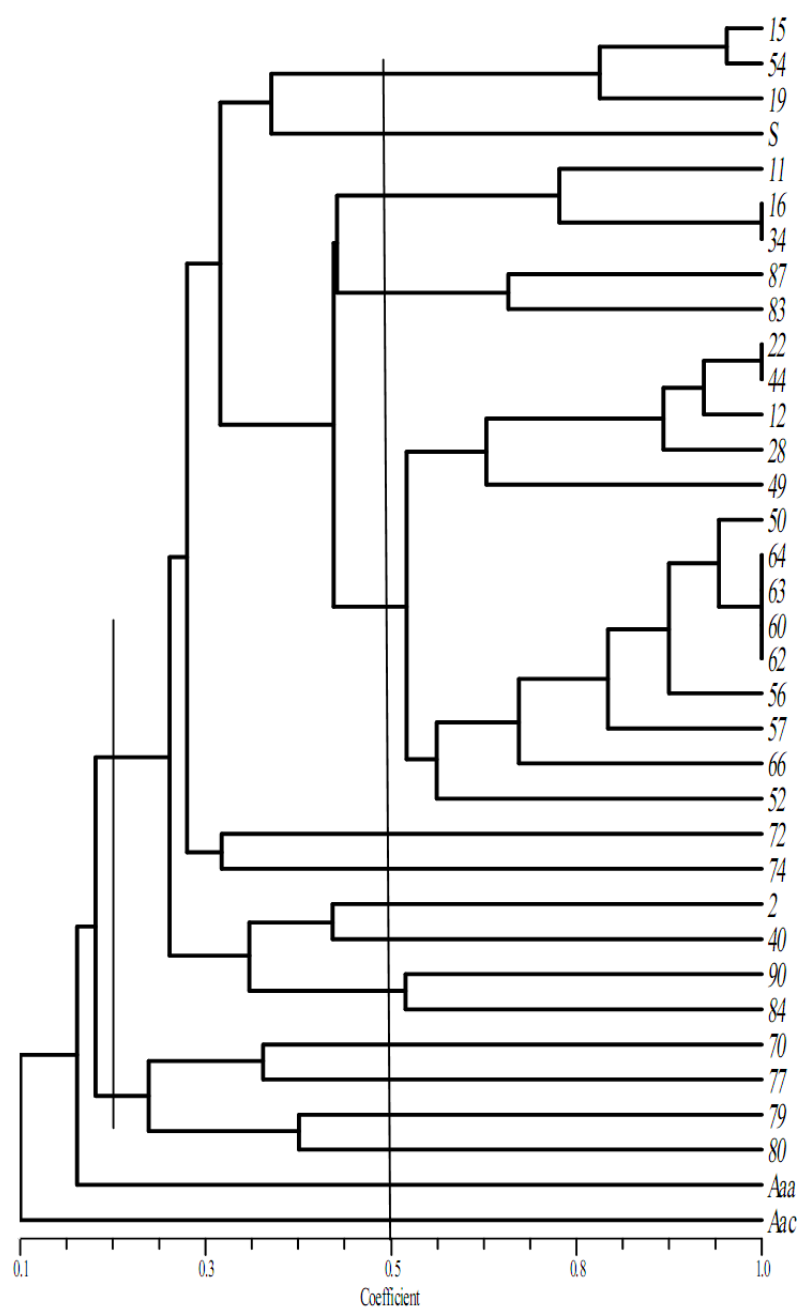
توالی‌های تکرار شونده BOX و ERIC در سرتاسر ژنوم باکتری‌های مختلف پراکنده اند و ممکن است نقش مهمی در سازمان دهی ژنوم باکتری‌ها داشته باشند. با ردیابی پراکنش این توالی‌ها در ژنوم باکتری‌ها با استفاده از روش rep-PCR می‌توان به ساختار، مسیر تکاملی ژنوم و نیز همسانی یا تنوع موجود در جمعیت‌های باکتری‌ها در مسیر تکاملی ژنوم دست یافت (Louws *et al.*, 1994). در این بررسی اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها با روش‌های BOX و ERIC-PCR تهیه شد. آنالیز خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، تنوع ژنتیکی بالائی را در جمعیت‌های *Ao* عامل نوار قهوه‌ای برنج نشان داد. دندروگرام حاصل از اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها با روش ERIC-PCR تنوع کمتری را نشان داد؛ جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰ و ۳۵ درصد به ترتیب به ۲ و ۵ گروه

مناسبی در تمایز جدایه‌های عامل نوار قهوه‌ای نداشته باشد. تفکیک و شناسایی دقیق جدایه‌های عامل نوار قهوه‌ای، با روش‌های متداول بیوشیمیایی و بررسی نقوش پروتئینی امکان پذیر نیست در حالی که وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی در زمینه تدوین و اتخاذ تدابیر مناسب پیشگیری و کنترل بیماری می‌تواند حائز اهمیت باشد. روش‌های سرولوژیکی، ایزوزیمی، آنالیز اسیدهای چرب و بررسی نقوش پروتئین‌های سلولی در الکتروفورز دو بعدی اغلب زمان بر و پرهزینه بوده و از حساسیت و دقت کافی جهت تخمین تنوع و نیز تعیین روابط فیلوژنی برخوردار نیستند (De Bruijn *et al.*, 1996). ارزیابی و تدوین روش‌های تشخیص و دقیق و افتراقی تمایز بر اساس رهیافت‌های مبتنی بر انگشت نگاری ژنتیکی کارایی مطلوبی داشته‌اند.



شکل ۶. دندروگرام الگوی اثر انگشت جدایه‌ها در آزمون BOX-PCR. جدایه‌های شماره ۱۵، ۱۹، ۵۴، ۲۲، ۵۰، ۴۴، ۴۹، ۶۳، ۶۰، ۱۲، ۶۴، ۶۲، ۲۸، ۵۶، ۵۷، ۲، ۸۳، ۷۴، ۶۶، ۷۷، ۸۷، ۷۲، ۷۰، ۳۴، ۱۱، ۱۶، ۴۰، ۹۰، ۸۴، ۵۲، ۸۰، ۷۹: جدایه‌های *Acidovorax oryzae* (Ao) از خزانه‌های برنج ساری. *Aaa*: جدایه مرجع ساری. *Aaa*: جدایه مرجع ساری. *Aac* (ICMP 254): جدایه مرجع *Ao*. *S* (ICMP 11902): جدایه مرجع *Ao*. *Aac* (ICMP 7500): جدایه مرجع *Ac*. (ICMP). تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شد.

Fig 6. Dendrogram of fingerprint pattern of isolates in BOX-PCR. The numbers 15, 19, 54, 22, 50, 44, 49, 63, 60, 12, 64, 62, 28, 56, 57, 2, 83, 74, 66, 77, 87, 72, 70, 34, 11, 16, 40, 90, 84, 52, 80, 79: *Acidovorax oryzae* (Ao) from Mazandaran nurseries. *Aaa*: standard isolate *Ao* (ICMP 254). *S*: standard isolate *Ao* (ICMP 11902). *Aac*= standard isolate *Ac* (ICMP 7500). Cluster analysis was performed by using the jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm.



شکل ۷. دندروگرام الگوی اثر انگشت جدایه‌ها در آزمون ERIC و BOX-PCR. جدایه‌های شماره ۱۵، ۱۹، ۵۴، ۱۱، ۱۶، ۳۴، ۸۷، ۸۳، ۲۲، ۴۴، ۱۲، ۲۸، ۴۹، ۵۰، ۶۴، ۶۳، ۶۰، ۶۲، ۵۶، ۵۷، ۶۶، ۵۲، ۷۲، ۷۴، ۲، ۴۰، ۹۰، ۸۴، ۷۰، ۷۷، ۷۹، ۸۰: جدایه‌های *Acidovorax oryzae* (Ao) از خزانه‌های برنج مازندران. Aaa: جدایه مرجع (Ao ICMP 254). S: جدایه مرجع (Ao ICMP 11902). Aac= جدایه مرجع (Ac ICMP 7500). تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شد.

Fig 7. Dendrogram of fingerprint patterns of isolates in ERIC and BOX-PCR. The numbers 15, 19, 54, 11, 16, 34, 87, 83, 22, 44, 12, 28, 49, 50, 64, 63, 60, 62, 56, 57, 66, 52, 72, 74, 2, 40, 90, 84, 70, 77, 79, 80: *Acidovorax oryzae* (Ao) from Mazandaran nurseries. Aaa: standard isolate Ao (ICMP 254). S: standard isolate Ao (ICMP 11902). Aac= standard isolate Ac (ICMP 7500). Cluster analysis was performed by using the jacard similarity coefficient and the UPGMA algorithm.

مطالعه دارای خصوصیات فنوتیپی (بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) مشابهی بودند؛ لذا این ویژگی‌ها نتوانست تنوع جدایه‌ها را منعکس سازد. با توجه به اینکه روش rep-PCR نتوانست تنوع بالای جدایه‌های *Ao* را به خوبی منعکس کند، این روش به عنوان یک روش مولکولی مفید می‌تواند جدایه‌های مختلف را از یکدیگر متمایز کند. با توجه به سابقه کشت و کار طولانی مدت برنج در مازندران، تنوع بالای جدایه‌ها می‌تواند نشانه بروز تغییرها، اضافه یا حذف شدن‌ها و جهش‌هایی باشد که به مرور زمان در جمعیت‌های باکتری اتفاق افتاده‌است.

دسته بندی شدند در حالیکه BOX-PCR، منجر به تمایز جدایه‌ها در سطح تشابه ۲۰ درصد، به ۷ گروه شد. دندروگرام ترسیم شده بر اساس ترکیب داده‌های حاصل از دو آزمون rep-PCR با ضریب کوفتتیک ۰/۹۲، تنوع جدایه‌ها را به خوبی نشان داد؛ بطوریکه جدایه استاندارد *Ac* به طور جداگانه در گروه مجزایی در کنار سایر جدایه‌ها قرار گرفت. این در حالی بود که آغازگرهای ERIC, BOX به تنهایی قابلیت تمایز جدایه *Ac* مرجع را از سایر جدایه‌های *Ao* نداشتند. نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های *Ao* مورد

## منابع

- Arabi, F., Nikraves, Z., Babaezad, V., Rezaeean, V., and Rahimian, H. 2006. Occurrence of bacterial leaf spot garden beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42: 665-669.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. 1999. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates: New York: Wiley.
- Bradbury, J. 1970. *Pseudomonas setariae*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*, 24:237.
- De Bruijn, F., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbach, U. and Louws, F. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. Pp. 497-502, In: Biology of plant-microbe interaction, Stacey, G., Mullin, B. and Gresshoff, P. (Eds.). USA, APS Press.
- Farris, J.S. 1969. On the cophenetic correlation coefficient. *Systematic Biology*, 18: 279-285.
- Gardan, L., Dauga, C., Prior, P., Gillis, M. and Saddler, G. 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.
- Garrity, G. M (Ed. in chief). 2005. The Proteobacteria, Part C, Vol II, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T (Eds.). 2<sup>nd</sup> Ed. New York, USA, Springer.
- Hayward, A. 1962. Studies on bacterial pathogens of sugar cane. II. Differentiation, taxonomy and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. *Occasional Papers. Mauritius Sugar Industry Research Institute*, 13: 13-17.
- Kadota, I. and Ohuchi, A. 1990. Symptoms and ecology of bacterial brown stripe of rice. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 24: 15-21.
- Klement, Z., Farkas, G. and Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.
- Koeuth, T., Versalovic, J. and Lupski, J.R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*, 5: 408-418.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F. 1994. Specific genomic fingerprints of

- phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295.
- Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174: 4525-4529.
- Rahimian, H. 1986. Incidence of bacterial stripe of rice in Iran. *Iran Agricultural Research*, 5: 63-71.
- Rohlf, F. 1998. NTSYS-pc.numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.02). *Department of Ecology and Evolution. State University of New York*.
- Rostami, M. and Taghavi, M. 2001. Etiology, distribution and phenotypical characterization of different isolates of the *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causal agent of bacterial stripe of rice in Fars and Kohgiluyeh and Boyerahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 37:69-84
- Schaad, N., Kado, C. and Sumner, D. 1975. Synonymy of *Pseudomonas avenae* Manns 1905 and *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen 1922. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25: 133-137.
- Schaad, N.W., Sowell Jr, G., Goth, R., Colwell, R. and Webb, R. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28: 117-125.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>rd</sup> Ed. USA, American Phytopathological Society Press.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A. 2008. Reclassification of Subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 434-446.
- Shahrokhi, A. 1995. Investigation, occurrence and distribution of bacterial stripe of rice in Gilan and Mazandaran and comparison with bacterial blight of corn. Thesis of Master science. Tarbiat Modares University. Pp 53.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 107-119.