

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<sup>۱</sup>، ناصر صفایی<sup>۱\*</sup>، حشمت اله رحیمیان<sup>۲</sup> و مهدی رستمی<sup>۳</sup>

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

چکیده

به منظور شناسایی و بررسی روابط جدایه‌های اکسیداز، آرژنین دی‌هیدرولاز 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 پروتئینی 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 پروتئینی و هم‌چنین خصوصیات بیماری‌زایی، نوع رقم و محل جغرافیایی جدایه‌های مورد مطالعه، یک یا چند جدایه نماینده از هر یک 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 برنج، 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

## مقدمه

2001, Jeng et al. 2001, Palleroni Anzai et al. 2000,  
(1993, Kersters et al. 1996, Laneet et al. 1985,

16S rRNA ژن RFLP-PCR به عنوان یک روش موفق  
در تمایز گونه های جنس های مختلف، به خصوص گروه  
سودوموناس های فلورسنت (Laguerre et al. 1994) و  
بررسی فیلوژنی جدایه های *P. fuscovaginae* و دیگر  
سودوموناس های فلورسنت های همراه با پوسیدگی غلاف  
برنج به کار گرفته شده است (Jaunet et al. 1995). این  
مطالعه در جهت شناسایی گونه های سودوموناس بیماری زا  
و ناشناخته مرتبط با پوسیدگی غلاف و هم چنین  
تعیین وضعیت تاکسونومیکی جدایه های نزدیک  
به گونه *P. fuscovaginae* که در مطالعات اولیه  
(Rostami et al. 2004) ماهیت آنها به درستی مشخص  
نگردیده بود با استفاده از آزمون های فنوتیپی، بیماری زایی،  
الگوی نقوش پروتئینی 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

بوته های برنج با علایم پوسیدگی غلاف و تغییر رنگ دانه  
از مزارع شالیکاری استان مازندران در فصل زراعی ۱۳۸۴  
جمع آوری شد. جداسازی و خالص سازی عامل بیماری با  
استفاده از روش های معمول آزمایشگاهی انجام گرفت.  
برای این منظور قطعاتی به ابعاد  $2 \times 0.5$  تا  $2 \times 1$   
سانتی متر از قسمت بین بافت سالم و آلوده جدا و به مدت  
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

بیماری پیچیده پوسیدگی غلاف (Sheath Rot Complex)  
یکی از بیماری های برنج است که عموماً با قهوه ای شدن  
یا پوسیدگی غلاف برگ پرچم و تغییر رنگ دانه  
توصیف می گردد. این بیماری در مناطق معتدل و  
گرمسیر برنج خیز دنیا به ویژه در مناطقی با بارندگی  
زیاد که مرحله آبستنی (Booting) و خوشه دهی  
همراه با کاهش دما باشد شایع است و باعث خسارت  
قابل توجه محصول در این مناطق می گردد  
(Zeigler & Alvarez 1987, Cottyn et al. 1996, Jaunet 1996). هر  
دو عامل قارچی و باکتریایی به عنوان مولد این  
بیماری معرفی شده اند و چون علائم ظاهری ایجاد شده  
توسط آنها مشابه می باشد، تشخیص واقعی تنها براساس  
علائم مشکل است (Cottyn et al. 1996, Naeimi et al. 2003).  
تاکون باکتری های متعددی به عنوان عوامل مرتبط با  
بیماری پیچیده پوسیدگی غلاف گزارش شده اند که از این  
بین جدایه های مربوط به گونه های اکسیداز آرژنین دی  
هیدرولاز مثبت سودوموناس به عنوان عمده ترین عوامل  
مرتبط با این بیماری هستند (Zeigler & Alvarez 1990, Zeigler & Alvarez 1990, Cottyn et al. 1996 ab). در  
مطالعات اولیه بر اساس خصوصیات فنوتیپی، جدایه های  
مشابه با گونه *P. fuscovaginae* به عنوان جدایه های  
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 مرحله ای  
به خصوص با استفاده از آنالیز میکروارگانیزم ها در سطح  
مولکولی نقش مهمی را در اصلاح رده بندی سودوموناس ها  
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. )

تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با غلظت  $10^8$  cfu در میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در غلاف برگ پرچم انجام شد. هر جدایه باکتری حداقل روی پنج پنجه روی دو بوته مایه‌زنی گردید. برای تیمار شاهد در هر یک از بوته‌ها تعداد یک یا دو پنجه با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند.

آزمون بیماری‌زایی در مرحله گیاهچه‌ای با تزریق  $10^8$  cfu از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری روی گیاهچه‌های برنج در مرحله سه تا چهار برگی (۱۵ تا ۲۰ روزه) انجام گرفت. تزریق در بین غلاف برگ در فاصله ۵ سانتی‌متر بالاتر از سطح گلدان و به مقداری که فضای بین غلاف پر گردد (۰/۱ میلی‌متر) انجام گرفت. حداقل چهار گیاهچه در هر گلدان به‌عنوان چهار تکرار برای هر جدایه باکتری و دو گیاهچه برای تیمار شاهد در نظر گرفته شد. هر یک از تیمارهای شاهد تنها با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند. جدایه‌هایی که موجب ایجاد نکروز حداقل به طول ۱۰ mm در اطراف محل تلقیح شدند به‌عنوان جدایه بیماری‌زا در نظر گرفته شدند (Zeigler & Alvarez 1987, Duveiller et al. 1998, )

(Zeigler and Alvarez 1990)

#### ۴- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، و فیزیولوژیکی

##### جدایه‌ها

خصوصیات بیوشیمیایی، و فیزیولوژیکی جدایه‌های مورد مطالعه (۳۰ جدایه) با ۶۵ آزمون (جدول ۲) وبا استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی انجام شد (Schaad et al. 2001, Mew and Cottyn 2001).

#### ۵- الکتروفورز پروتیین

مقایسه نقوش پروتیین‌های سلولی جدایه‌ها با الکتروفورز

مذکور روی محیط کشت کینگ - ب (KB) در دو تکرار مخطط و در دمای  $1 \pm 27$  درجه سلیسیوس نگره‌داری گردیدند. بعد از ۴۸ ساعت حداقل سه کلنی متفاوت از لحاظ شکل، رنگ و اندازه انتخاب و برای خالص‌سازی مجدد روی محیط KB مخطط شد. برای جداسازی عامل بیماری از بذر تعداد ۲۰ عدد بذر از هر یک از نمونه‌ها که دارای علائم تغییر رنگ بودند انتخاب و بعد از شستشوی سطحی به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه از آنها نیز مانند روش ذکر شده برای نمونه‌های غلاف جداسازی عامل بیماری انجام شد.

#### ۲- جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه

جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق از نمونه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۴ با علائم پوسیدگی غلاف و تغییر رنگ دانه (۱۷ جدایه)، جدایه‌های جدا شده از گیاهچه با علائم بلایت (۵ جدایه)، جدایه‌های جدا شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از بذر و غلاف‌های آلوده از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ مرکز تحقیقات برنج آمل (۱۳ استرین) و جدایه‌های استاندارد *B. Burkholderia andropogonis* (IBSBF 1890) (IBSBF 199) ، *Pseudomonas fuscovaginae gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF 973) ، *P. fluorescense* و *P. marginalis*.P. s. pv. *syringae* (CFBP1655) تهیه شده از کلکسیون‌های IBSBF برزیل، CFBP فرانسه، آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی ساری و موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، اوین، تهیه شد (جدول ۱).

#### ۳- آزمون بیماری‌زایی

آزمون روی ارقام برنج فجر در دو مرحله آبستنی (Booting) و گیاهچه‌ای (۱۵ تا ۲۰ روزه) انجام گرفت. آزمون بیماری‌زایی روی گیاهان بالغ در مرحله آبستنی با

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

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

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

+ : 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، ۱، شاهد منفی، ۲، جدایه استاندارد *P. s. pv. syringae*، ۳، جدایه استاندارد *P. fuscovaginae*، ۴، جدایه استاندارد *P. marginalis*، ۵، جدایه ۱۰۴۱، ۶، جدایه ۱۱۱، ۷، جدایه ۱۱۴، ۸، جدایه ۱۵، ۹، جدایه ۱۶، ۱۰، جدایه ۳۴، ۱۱، جدایه ۳۵، ۱۲، جدایه ۴۲، ۱۳، جدایه ۲۰۱، ۱۴، جدایه استاندارد *B. andropogonis*، ۱۵، جدایه استاندارد *B. gladioli pv. gladioli*، ۱۶، جدایه استاندارد *Acidovorax avenae*، 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*)

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

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

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

\*: 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

بیماری زایی، 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

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؛

#### ۸- RFLP مبتنی بر PCR ژن 16S rRNA

آغازگرهای '5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' (A1) و '5'-TTG CGG GAC TTAACC CAA CAT-3' (B6) (ساخت شرکت تولیدی سینا ژن ایران) برای تکثیر ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی به کار 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، ۰/۲۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۵۰۰ mM KCl، Tris-HCl (pH ۸/۴)، ۲۰۰ از هر یک از نوکلئوتیدها، ۲۰ pmol از هر آغازگر و پنج واحد از آنزیم پلی مرز (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 به مدت چهار دقیقه سپس ۳۰ تا ۳۵ سیکل به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای ۶۰ °C به مدت یک دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ °C به مدت یک دقیقه انجام شد. بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت 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 هر یک از آنزیم‌های *TaqI*، *AluI*، *HindIII*، *HinfI* (Takara) *Msp I* بر اساس 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]، ۰/۱ Tris - MHC1، ۲ mM EDTA) با ولتاژ ثابت ۵ V/cm به همراه یک نشانگر اندازه

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

#### ۶- استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی به روش پورئوس 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 مقدار و 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 از آغازگرهای PS-for/ PS-rev به روش ویدمر و همکاران (Widmer et al. 1998) انجام شد.

PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید که اجزای واکنش متشکل از بافر با غلظت یک برابر، ۱/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲ mM از هر یک از نوکلئوتیدها، ۲/۵ واحد از آنزیم پلی مرز (Taq DNA Polymerase Cinna Gen) بود.

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

ناقص داشتند. خوشه‌های ظاهر شده اغلب دارای سنبلیچه‌های 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 از مایع‌زنی 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 به صورت گروه تک عضوی گروه‌بندی شدند (شکل ۱).

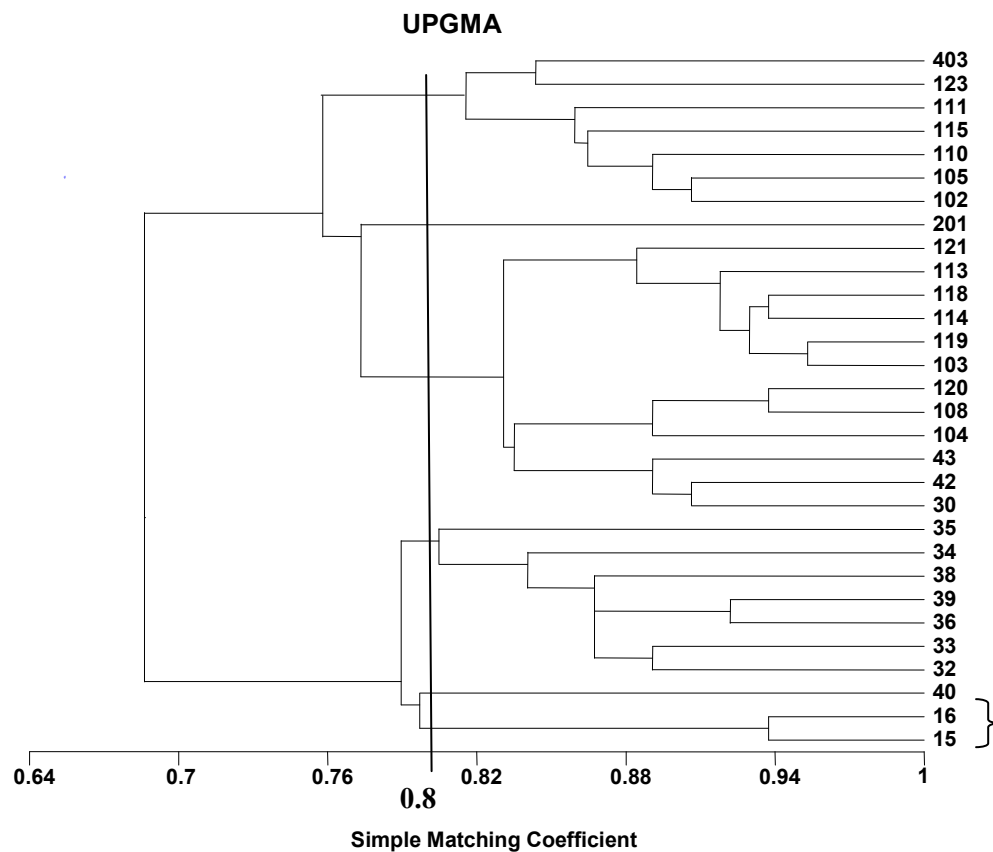
همه خوشه‌ها در آزمون‌های واکنش گرم، فوق حساسیت، تولید لوان، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، هیدرولیز اسکولین، اوره آز، آربوتین، تولید ایندول، رشد در شرایط غیر هوازی، واکنش متیل رد (MR)، VP، رشد در محیط حاوی اینولین و بتا‌آلانین، تولید اسید از دولیسیتول و مانوز، تولید قلیا از دی - تارتارات، آرژنین و کوبینات واکنش منفی داشتند و در آزمون‌های کاتالاز، تولید رنگ‌دانه فلورسنت، کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز آرژنین، رشد در کلرید سدیم ۳٪، استفاده از بتاین و تولید قلیا از استات، مالئات و سترات 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

(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 MVSP مورد 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 به طول پنج تا ۱۰ سانتی‌متر روی غلاف برگ تبدیل شدند. علائم روی غلاف برگ پرچم دو تا سه روز بعد از مایع‌زنی، ابتدا به صورت نقاط آبسوخته ظاهر شدند که سپس این لکه‌ها نکروزه شده و به صورت 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 به صورت لکه‌های خاکستری تا قهوه‌ای تیره در محل تلقیح محدود شد جدایه‌هایی که تنها موجب تغییر رنگ بذرهای می‌شدند به‌عنوان جدایه‌های با توان بیماری‌زایی ضعیف محسوب شدند. ظهور خوشه‌ها از غلاف‌های آلوده در بیشتر موارد به صورت ناقص صورت می‌گرفت. به طوری که یک سوم تا یک چهارم انتهایی خوشه از غلاف خارج نمی‌شد و محور سنبلیچه‌ها رشد



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 تغییر رنگ‌دانه (مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است).

**Fig. 1.** Dendrogram 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).

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، لسیستیناز و واکنش فوق حساسیت روی توتون از آن

آزمون‌ها متفاوت با این گونه بودند و شباهت بیشتری با *P. fluorescens* biov III داشتند. مقایسه نقوش پروتئینی 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 پروتئینی 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



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 تقریباً 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 به فرد 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 H<sub>2</sub>S 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

متفاوت بودند. خصوصیات فنوتیپی زیرگروه B2 نشان داد این زیرگروه تشابه بالایی با *P. fluorescens* biov I دارد. این زیرگروه در خصوصیات مانند تولید اسید از قندهای ترهالوز، سوکرز، 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 جزئی در دانه‌ها شد. زیرگروه B3 از سه جدایه ۳۰، ۴۲ و ۴۳ 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 دهیدرولاز مثبت 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 (زیرگروه B3) 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

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

آغازگرهای ویژه‌ی جنس سودمونس که بر اساس ژن 16S rRNA طراحی شده‌اند، برای تشخیص و متمایز کردن جدایه‌های متعلق به جنس سودمونس از جدایه‌های جنس‌های نزدیک و مرتبط با بیماری پوسیدگی غلاف برنج (*Acidovorax avenae*, *B. glumae*, *B. gladioli*) و همچنین برای ارزیابی جدایه‌های فلورستتی که دارای خصوصیات فنوتیپی متفاوت از گونه‌های متداول شناخته شده در این جنس بودند، به کار گرفته شد. آغازگرهای PS-rev PS-for/ موجب تکثیر قطعه ژنومی به طول تقریبی ۹۹۰kb برای همه جدایه‌های مورد مطالعه در این بررسی شدند (شکل ۲).

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

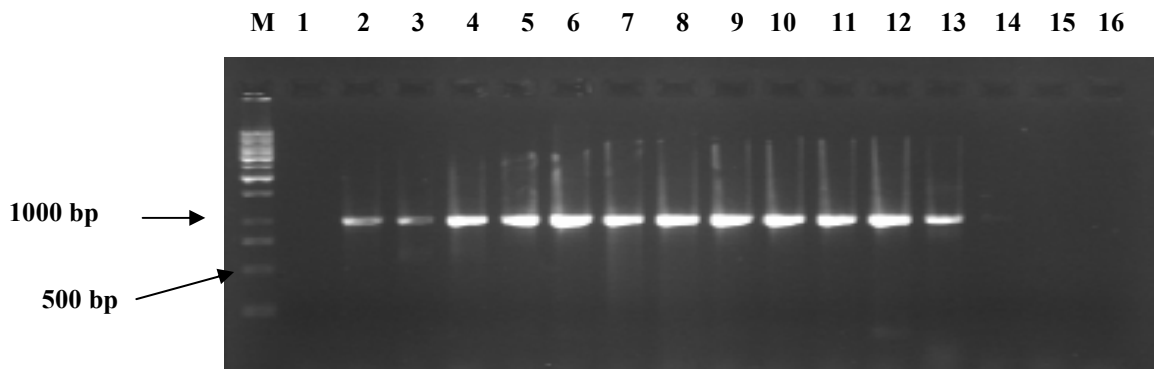
الگوی برش حاصل از محصولات PCR قطعه ژنی 16S rRNA برای بررسی وضعیت تاکسونومی جدایه‌های اکسیداز و آرژنین دهیدولاز مثبت مرتبط با برنج در سطح گونه و همچنین بررسی روابط فیلوژنتیک بین آنها به کار گرفته شد. برای این منظور جدایه‌های نماینده انتخاب شده (۱۳ جدایه) از خوشه‌های A، B، C و D با سه جدایه استاندارد *P.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

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

بر اساس 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 *HinfI* (الگوی برش B) از آن متمایز می‌گردد. 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 *HinfI* (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 به عنوان تنها جدایه ژنوتیپ VI در فاصله بسیار دور نسبت به سایر جدایه‌ها گروه‌بندی شد. این جدایه بر اساس الگوی برش ایجاد شده توسط آنزیم *TaqI* از سایر جدایه‌ها متمایز می‌گردد (شکل ۴ و جدول ۳).

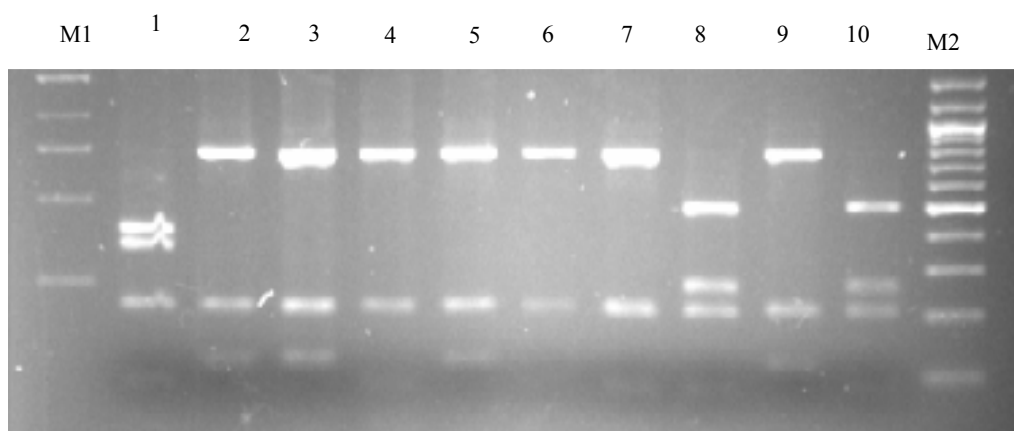
## بحث

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



شکل ۲. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس 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.



شکل ۳. الگوهای برش ایجاد شده محصولات PCR قطعه ژنی 16SrRNA با آنزیم برشی *HinfI*.

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

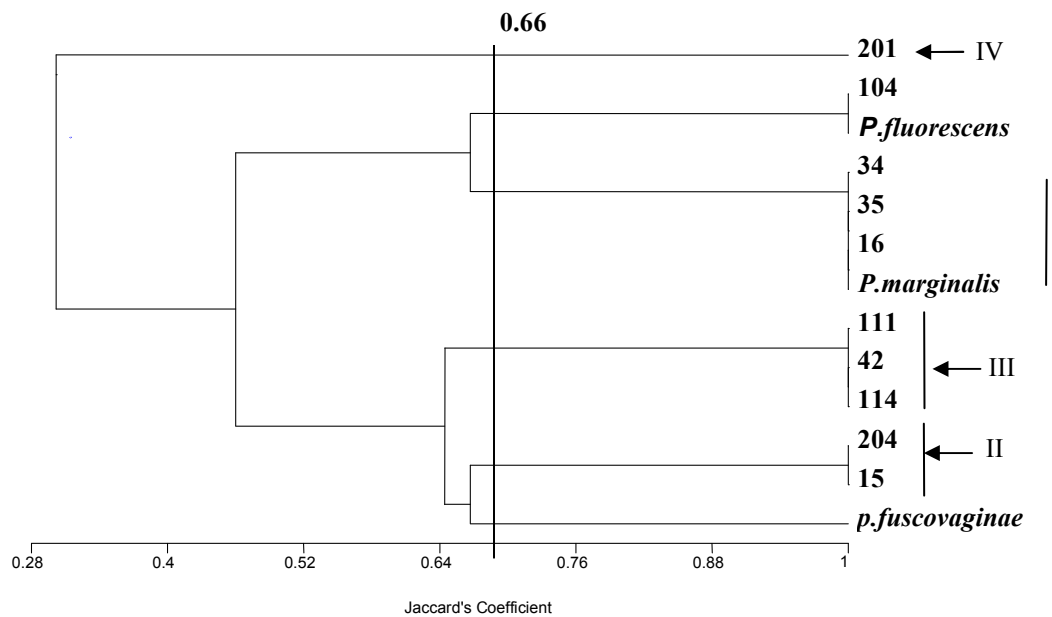
M، مارکر ۱ Kb؛ ۱، جدایه استاندارد *P. fuscovaginae*؛ ۲، جدایه استاندارد *P. marginalis*؛ ۳، جدایه استاندارد *P. fluorescens*؛ ۴، جدایه ۱۵؛ ۵، جدایه ۱۶؛ ۶، جدایه ۲۰۱؛ ۷، جدایه ۲۰۴؛ ۸، جدایه ۱۱۴؛ ۹، جدایه ۳۵؛ ۱۰، جدایه ۴۲؛ M2، مارکر ۱۰۰ bp.

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

حاصل از خصوصیات فنوتیپی، الکتروفورز پروتئین 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

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



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 strains 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

جدول ۳. ژنوتیپ‌های حاصل از آنالیز برش محصولات PCR ژن 16S rRNA

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

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

\*: 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 به صورت حروف بزرگ (A - C) مشخص شدند.

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

*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 ketogluconate-2 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.

بر اساس 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، الکتروفورز 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 ژنوتیب 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 ژنوتیب 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 تاکسونومیکي آن نیازمند مطالعات بیشتر مانند تعیین توالی ژن‌های اپران ریپوزومی به‌خصوص قطعه ژنی 16S rRNA می‌باشد.

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 al. 1996). با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از الگوهای برشی آنزیم‌های برشی جدایه‌های مورد مطالعه در شش کلاستر و ژنوتیب متمایز از هم گروه‌بندی شدند که از این بین جدایه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه در چهار ژنوتیب شامل ژنوتیب *P. marginalis* و سه ژنوتیب متمایز از هم و متفاوت از جدایه‌های استاندارد مورد مقایسه قرار گرفتند. هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه دارای ژنوتیب 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 (Miyajima et al. 1983) و توسط افراد دیگر نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Duvelier 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 et al. 1995). مقایسه خصوصیات فنوتیپی خوشه D (جدایه ۱۵ و ۱۶)، که در مطالعات اولیه توسط رستمی و همکاران به‌عنوان جدایه‌های با خصوصیات مشابه

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 پروتینی این جدایه‌ها بیانگر تشابه بالای آنها با *P. marginalis* می‌باشد.

در مطالعات متعدد دیگر نیز جدایه‌هایی با ویژگی‌های فوق‌الذکر 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 جزئی در خوشه‌ها شدند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، نقوش پروتینی 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 جزئی 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

براساس مجموع خصوصیات فنوتیپی، نقوش پروتینی 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 et 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 دی‌هیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید اسید از مانیتول، سوربیتول و ترهالوز مشابه هم می‌باشند. ولی

حقوق‌شناس، لیلا زارع و هم‌چنین کارکنان بخش گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات برنج آمل که در انجام این تحقیق صمیمانه همکاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

### منابع

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

*P. fluorescens* (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 ریوزومی می‌باشد.

### سپاسگزاری

از آقایان مهندس منصور بهرامی، مهندس وحید خسروی، مهندس ابوالقاسم قاسمی و خانم‌ها فرشته عربی،