ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۲۰۱- ۱۹۳

مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* از مزارع برنج استان گیلان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

اعظم طاهری شهرستانی*[۱]، سیدعلی الهی‌نیا[۲]، مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور[۳]، علی‌اکبر عبادی[۴]

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب کارشناس ارشد، استاد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان
۴- دانشجوی دکتری و مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات برنج کشور

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:azamtaheri98@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

بلایت باکتریایی برگ برنج، ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) بوده و یک بیماری مهم در سرتاسر آسیا است. کاهش محصول ناشی از این بیماری، از ۱۰ تا ۷۰ درصد در مزارع شدیداً آلوده گزارش شده است. در این بررسی، تنوع ژنتیکی ۶۰ جدایه *Xoo*، با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع، نشانگرهای مورد استفاده، ۱۸۷ نوار چند شکل ایجاد کردند. تجزیه واریانس مولکولی داده‌های RAPD نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی نسبت به بین جمعیت‌ها بیشتر بوده است. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده، ایجاد شده و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و توسط نرم‌افزار NTSYS-pc انجام گردید. در سطح تشابه ۰/۶ جدایه‌ها به سه گروه تقسیم شدند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که نشانگرهای RAPD به کار گرفته شده در این بررسی، قادر به تمایز جدایه‌های خزانه و مزرعه از یکدیگر بودند.

واژه‌های کلیدی

برنج،
بلایت باکتریایی،
تنوع ژنتیکی،
جدایه،
RAPD،
***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.**

مقدمه

بلایت باکتریایی برگ برنج ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) Ishiyama 1922 بوده و یک بیماری مهم در سراسر آسیا محسوب می‌شود (Mew 1987). این بیماری یک نوع بیماری آوندی است که طی آن باکتری *Xoo* از راه زخم و روزنه‌ها وارد آوند چوبی شده، همچنان به رشد ادامه داده و آوندهای چوبی توسط سلول‌های باکتری و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مسدود می‌گردند (Ferluga et al. 2007). کاهش محصول ناشی از این بیماری، از ۱۰ تا ۷۰ درصد در مزارع شدیداً آلوده گزارش شده است (Nei 1987; Noda et al. 1996). تنوع نژادی در *Xoo* قابل ملاحظه است. بیش از ۳۰ نژاد با بیماری‌زایی مختلف در سراسر جهان گزارش شده است (Noda et al. 1996). تغییرات ساختار نژادی درون جمعیت ممکن است از عواملی مانند تغییر ژنتیکی (جهش یا نوترکیبی در پاسخ به فشارهای محیطی و یا کشاورزی) یا مهاجرت از سایر نقاط جغرافیایی، ناشی شود. بنابراین جهت هدایت انتخاب و به کارگیری ژن‌های مقاومت، نیاز است تا ساختار جمعیتی عامی بیماری‌زا درک گردد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

ساختار جمعیتی، به مقدار تنوع ژنتیکی درون یک جمعیت، روابط فیلوژنتیک بین و درون زیرجمعیت‌ها[1] و تقسیم‌بندی تنوع در مکان و زمان اشاره دارد (Leung et al. 1993). جهت بررسی تنوع ژنتیکی از روش‌ها و نشانگرهای مولکولی مختلف استفاده گردیده است. در مطالعه‌ای که توسط Sukhwinder et al. (2003) صورت گرفت، دی. ان.ای حاصل از ۶۹۳ جدایه *Xoo* با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PJEL1 و PJEL2) مورد بررسی قرار گرفتند. روش UPGMA سطح بالایی از تنوع در جدایه‌ها را نشان داد. در چین جمعیت‌های *Xoo* بر اساس الگوهای بیماریزایی روی پنج واریته هندی و ژاپنی برنج مورد بررسی قرار گرفتند و هفت نژاد از *Xoo* از مجموع ۸۳۵ جدایه جمع‌آوری شده در نواحی مختلف در چین شناسایی شدند (Fang et al. 1990). Gang et al. (2009) به منظور ارزیابی ساختار جمعیتی *Xoo* و جهت بررسی تنوع ژنوتیپی و نژادی *Xoo* در چین از روش RFLP استفاده کردند. Jyufuku et al. (2009)، ۵۷ جدایه *Xoo* جمع‌آوری شده از چندین کشور برنج‌خیز در آسیا (هند، اندونزی، مالزی، تایلند، تایوان و فیلیپین) را با استفاده از روش RFLP و آزمون بیماری‌زایی مورد بررسی قرار دادند. جدایه‌های مورد بررسی بر مبنای نتایج حاصل از RFLP در چهار گروه قرار گرفتند. در تحقیق Hu et al. (2007) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ جدایه *Xoo* از نه کشور برنج خیز با استفاده از RFLP و RAPD، داده‌های حاصل از RAPD منجر به گروه‌بندی ۳۲ جدایه در شش گروه در سطح تشابه ۲۲ درصد شد. بیشتر جدایه‌های *Xoo* همراه با جدایه‌هایی که از ناحیه جغرافیایی مشابه جمع‌آوری شده بودند گروه‌بندی شدند و این بیانگر این است که جدایه‌های مذکور روابط ژنتیکی نزدیکی دارند. Gupta et al. (2001) در تحقیقی ۶۰ جدایه *Xoo* از هند به همراه دو جدایه از فیلیپین را با استفاده از دو روش RAPD-PCR و PCR برمبنای *IS1112* مورد بررسی قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از دو روش مذکور، در سطح تشابه ۰/۵۷ درصد، منجر به گروه‌بندی جدایه‌های هندی در پنج گروه گردید و جدایه‌های فیلیپینی به طور ضعیف با آن‌ها گروه‌بندی شدند. گروه‌بندی جدایه‌ها تا حدی مطابق با نژاد جدایه‌های مورد بررسی بود. در ایران کارهای اندکی روی این باکتری صورت گرفته است و محدود به جداسازی و شناسایی باکتری مذکور از نمونه‌های آلوده برنج در خزانه، مزرعه و خوشه و با استفاده از روش‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی و تست بیماری‌زایی بوده است (Asemaninejad 2008; Khoshkdaman 2007; Ghasemi 2007) همچنین در تحقیقی با استفاده از آزمون‌های PCR و BIO-PCR با آغازگرهای اختصاصی امکان بذرزاد بودن باکتری *Xoo* اثبات شد (Asemaninejad 2008). در حال حاضر، اطلاعات اندکی در مورد ساختار جمعیتی این باکتری در ایران وجود دارد. هدف از انجام این پژوهش این بود که آیا جدایه‌های *Xoo* که با استفاده از آزمایش‌های مختلف شناسایی شده‌اند، از نظر ژنتیکی متفاوت می‌باشند و در صورت وجود تنوع، کدام یک از عوامل تنوع ارقام، تنوع مناطق جغرافیایی و یا تنوع در مرحله رویشی گیاه برنج هنگام نمونه‌برداری می‌تواند تأثیرگذار باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی و استخراج DNA

در این تحقیق در مجموع، ۶۰ جدایه باکتریایی که از مزارع مختلف استان گیلان جمع‌آوری شده و توسط آزمون‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آزمون بیماریزایی به عنوان باکتری *Xoo* شناسایی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. اسامی جدایه‌ها و محل جمع‌آوری آن‌ها در جدول یک آمده است. این جدایه‌ها از مناطق مختلف استان گیلان (غربی، مرکزی و شرقی) و از چهار رقم مختلف برنج (خزر، صدری، هاشمی و علی‌کاظمی) جمع‌آوری شده بودند. همچنین از ۶۰ جدایه مذکور، ۲۵ جدایه از برگ برنج در خزانه، ۲۴ جدایه از برگ برنج در مزرعه و ۱۱ جدایه از خوشه جداسازی شده بودند. جدایه‌های جمع‌آوری شده در گلیسرول ۱۵درصد و در دمای $-70\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند. دی.ان.ای ژنومی کلیه جدایه‌ها به روش CTAB (Leach et al. 1992) استخراج شد. خلوص و غلظت دی.ان.ای استخراج شده از طریق مقایسه با یک λ-DNA استاندارد و با وزن مولکولی معین (۵۰ نانوگرم/میکرولیتر) روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE 1X مورد بررسی قرار گرفت. جهت تخمین دقیق

[1] Subpopulations

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

غلظت دی.ان.ای استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلBeckman coulter DU530) استفاده شد. به دلیل تفاوت غلظت دی.ان.ای در نمونه‌های مختلف، جهت یکنواخت کردن غلظت دی.ان.ای در همه نمونه‌ها، تمامی نمونه‌های استخراج شده به یک غلظت واحد (۵۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) رسانده شدند.

آغازگرهای RAPD و واکنش PCR در ابتدا ۱۴ آغازگر RAPD روی دی.ان.ای ژنومی دو جدایه به طور تصادفی (F23 و N24) آزمایش شدند و در نهایت هشت آغازگری که توانستند نوارهای الکتروفورزی واضح و با قابلیت تولید مجدد ایجاد نمایند، انتخاب شدند. نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول دو آمده است.

جدول ۱- مشخصات مربوط به جدایه‌های *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* مورد استفاده در این تحقیق

نام اختصاری جدایه	رقم	مکان جداسازی	محل جمع‌آوری	نام اختصاری جدایه	رقم	مکان جداسازی	محل جمع‌آوری
N1	خزر	خزانه	رشت	F6	صدری	مزرعه	لاهیجان
N2	خزر	خزانه	لاهیجان	F7	خزر	مزرعه	لاهیجان
N3	خزر	خزانه	لنگرود	F8	هاشمی	مزرعه	رشت
N4	هاشمی	خزانه	رشت	F9	صدری	مزرعه	رشت
N5	علی کاظمی	خزانه	رشت	F10	هاشمی	مزرعه	فومن
N6	هاشمی	خزانه	رشت	F11	علی کاظمی	مزرعه	انزلی
N7	صدری	خزانه	رشت	F12	هاشمی	مزرعه	رشت
N8	علی کاظمی	خزانه	صومعه‌سرا	F13	علی کاظمی	مزرعه	انزلی
N9	علی کاظمی	خزانه	کوچصفهان	F14	علی کاظمی	مزرعه	انزلی
N10	خزر	خزانه	شلمان	F15	خزر	مزرعه	صومعه‌سرا
N11	هاشمی	خزانه	رشت	F16	خزر	مزرعه	لنگرود
N12	هاشمی	خزانه	رشت	F17	هاشمی	مزرعه	لنگرود
N13	خزر	خزانه	رشت	F18	هاشمی	مزرعه	صومعه‌سرا
N14	هاشمی	خزانه	کلاچای	F19	هاشمی	مزرعه	رشت
N15	هاشمی	خزانه	آستانه	F20	خزر	مزرعه	صومعه‌سرا
N16	صدری	خزانه	شفت	F21	صدری	مزرعه	رودبار
N17	هاشمی	خزانه	تالش	F22	هاشمی	مزرعه	رشت
N18	خزر	خزانه	رودبار	F23	هاشمی	مزرعه	رشت
N19	علی کاظمی	خزانه	رستم‌آباد	F24	هاشمی	مزرعه	رودبار
N20	صدری	خزانه	رشت	P1	هاشمی	خوشه	کیاشهر
N21	خزر	خزانه	رشت	P2	علی کاظمی	خوشه	کیاشهر
N22	هاشمی	خزانه	رشت	P3	خزر	خوشه	آستانه
N23	هاشمی	خزانه	انزلی	P4	صدری	خوشه	رشت
N24	خزر	خزانه	فومن	P5	صدری	خوشه	حسن‌رود
N25	هاشمی	خزانه	رودسر	P6	خزر	خوشه	لاهیجان
F1	صدری	مزرعه	رشت	P7	هاشمی	خوشه	فومن
F2	هاشمی	مزرعه	لنگرود	P8	هاشمی	خوشه	انزلی
F3	صدری	مزرعه	لاهیجان	P9	صدری	خوشه	رشت
F4	خزر	مزرعه	لاهیجان	P10	هاشمی	خوشه	رودبار
F5	هاشمی	مزرعه	رشت	P11	خزر	خوشه	رشت

جدول ۲- نام و ردیف بازی آغازگرهای RAPD مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر
70.9	5´TGCAGCACCG 3´
80.7	5´GCACGCCGGA 3´
H13	5´GACGCCACAC 3´
OPK07	5´AGCGAGCAAG 3´
OPA04	5´AATCGGGCTG 3´
OPA10	5´GTGATCGCAG 3´
OPA11	5´CAATCGCCGT 3´
OPA12	5´TGGCCCTCAC 3´

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

هر مخلوط واکنشی PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تهیه و با لایه‌ای از روغن معدنی، پوشانده شد. مخلوط واکنشی شامل ۵۰ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی، ۰/۴ میکرومولار آغازگر مورد استفاده، ۰/۲۵ میلی‌مولار dNTPs، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، و ۲ واحد آنزیم *Taq*پلیمراز بود. کلیه واکنش‌های RAPD-PCR توسط یک ترموسایکلر مدل my cycler ساخت شرکت BioRAD انجام و برنامه حرارتی طبق جدول سه، برای هر واکنش تنظیم گردید(Gupta et al. 2001). محصولات PCR تا زمان انجام الکتروفورز در دمای ۴ $^{\circ}C$ نگهداری شدند.

جدول ۳- برنامه حرارتی برای انجام واکنش RAPD-PCR

نام مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
واسرشته سازی اولیه	۹۵ $^{\circ}c$	۵ دقیقه	۱
واسرشته سازی	۹۴ $^{\circ}c$	۱ دقیقه	۴۵
اتصال آغازگر	۳۶ $^{\circ}c$	۱ دقیقه	
بسط آغازگر	۷۲ $^{\circ}c$	۲ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲ $^{\circ}c$	۵ دقیقه	۱

الکتروفورز و تجزیه آماری

نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و در بافر TBE 1X به مدت ۱۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز شدند. در چاهک اول هر ژل نشانگر اندازه (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder از شرکت Fermantas) مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه ژل داک تحت نور ماورای بنفش با طول موج ۳۱۲ نانومتر باندها مشاهده و تصاویر ژل‌ها با استفاده از دوربین دستگاه مورد ثبت واقع شد. جهت محاسبه وزن مولکولی باندهای تشکیل شده در هر ژل با استفاده از نرم‌افزار Quantity One، ابتدا وزن مولکولی باندهای نشانگر اندازه به نرم‌افزار داده شده و سپس بر اساس آن وزن مولکولی هر باند بر حسب جفت باز (bp) محاسبه گردید. امتیازدهی باندها به صورت مشاهده‌ای (با استفاده از برخی امکانات نرم‌افزار فتوشاپ[1]) و بر مبنای صفر و یک انجام شد. به این ترتیب که در هر نمونه در صورت حضور یک باند امتیاز یک و در صورت عدم حضور آن، امتیاز صفر ثبت گردید.

[1] Photoshop

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده، سه نرم‌افزار NTSYS-pc و POPGENE و Genealex مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تعداد و دامنه نوارهای تولید شده توسط آغازگرها هشت آغازگر به کار رفته در این تحقیق در کل ۱۸۷ نوار مختلف ایجاد کردند. تمامی جایگاه‌های تکثیر شده، چند شکل بودند و هیچ جایگاه یک شکلی در بین قطعات تکثیر شده مشاهده نشد. اندازه نوارها از ۸۳ تا ۳۶۹۸ جفت باز متغیر بود. بزرگترین قطعه توسط آغازگر 80.7 و کوچک‌ترین قطعه توسط آغازگر OPK07 تکثیر شد. آغازگر OPK07 با ۲۷ نوار و آغازگر OPA12 با ۲۰ نوار، بیشترین و کمترین تعداد قطعات تکثیر شده را ایجاد کردند. متوسط ایجاد نوار برای هر آغازگر ۲۳/۳۷۵ بود. اطلاعات مربوط به نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرها در جدول چهار ارائه شده است. نمونه‌ای از الگوی نواربندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی در شکل یک آمده است.

نتایج حاصل از دسته‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها

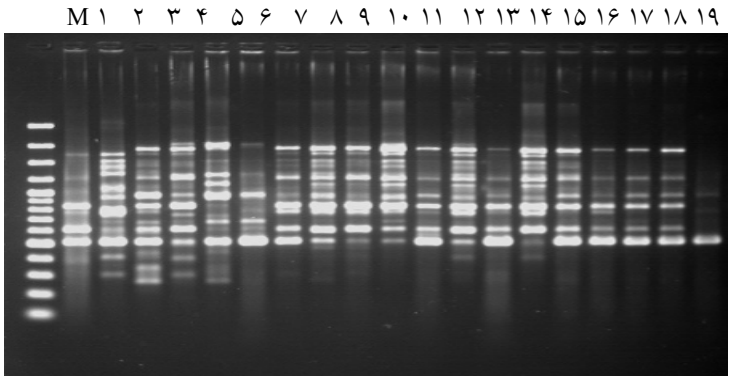
دسته‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای توسط نرم‌افزار NTSYS-pc و توسط ضریب تشابه تطابق ساده و به روش UPGMA انجام شد. بر اساس فواصل ادغام شده و با توجه به ضرایب تشابه، خط برش در نقطه ۰/۶ در نظر گرفته شد. حروف K، S، H و A در دندروگرام ترسیم شده بیانگر ارقام خزر، صدری، هاشمی و علی‌کاظمی می‌باشند.

جدول ۴- مقایسه آغازگرها از نظر تعداد تولید نوار، دامنه نوارهای تکثیر شده و متوسط فراوانی تکثیر

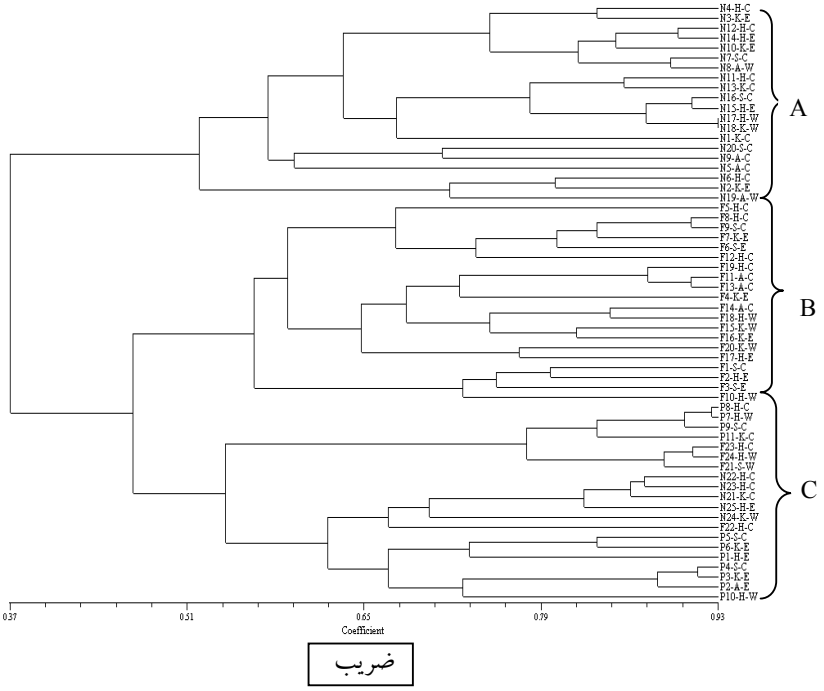
آغازگر	تعداد نوارهای تکثیر شده	دامنه نوارهای تکثیر شده (جفت باز)	متوسط فراوانی تکثیر
70.9	۲۴	۱۳۱-۲۷۱۵	۰/۳۵
80.7	۲۲	۲۶۹-۳۶۹۸	۰/۴۱
H13	۲۱	۲۱۶-۳۹۵۱	۰/۳۷
OPK07	۲۷	۸۳-۲۶۸۶	۰/۴۷
OPA04	۲۵	۱۶۶-۲۶۲۶	۰/۴۶
OPA10	۲۲	۱۱۱-۳۳۶۷	۰/۵۷
OPA11	۲۶	۱۴۲-۳۴۸۵	۰/۴۲
OPA12	۲۰	۲۰۰-۳۴۴۷	۰/۳۳

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]



شکل ۱- الگوی نواربندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *Xoo* توسط آغازگر 80.7: M (نشانگر اندازه Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder)، شماره‌های ۱ تا ۱۹ به ترتیب شامل جدایه‌های: N1، N2، N3، N4،N5، N6، N7، N8، N9، N10، N11، N12، N13، N14، N15، N16، N17، N18 و N19 می‌باشند.



شکل ۲- دندروگرام به دست آمده برای ۶۰ جدایه *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* با استفاده از ضریب تشابه SM و روش UPGMA بر اساس داده‌های RAPD روی DNA ژنومی

همان طور که مشاهده می‌شود جدایه‌های جمع‌آوری شده از ارقام مختلف به صورت پراکنده طبقه‌بندی شده و در خوشه مشخصی قرار نگرفته‌اند. این امر بدان معنی است که تنوع ارقام، تأثیری بر تنوع عامل بیماری‌زای مورد بررسی نداشته است. این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. به عنوان مثال در تحقیقی که توسط Adhikari et al. (1999) بر روی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Xoo* در نپال صورت گرفت، تنوع جدایه‌های جمع‌آوری شده از واریته‌های برنج سنتی و اصلاح شده مشابه بود که نشان‌دهنده این است که تنوع میزبان تاثیری بر تنوع عامل بیماری‌زا ندارد. همچنین در مقایسه‌ای که از واریته‌ها و اگرواکوسیستم‌های مختلف توسط Aedales et al. (1996) در فیلیپین صورت گرفت، بیان شد که تنوع میزبان بر تنوع عامل بیماری‌زا بی تأثیر است. حروف C، W و E در دندروگرام، بر مناطق مرکزی، غربی و شرقی استان گیلان که جدایه‌ها مورد جمع‌آوری قرار گرفته بودند،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

دلالت دارد. همان طور که در شکل دو مشاهده می‌شود، جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گیلان به طور مجزا گروه‌بندی نشده اند. یعنی با توجه به دندروگرام، در مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی جدایه‌ها ناشی از تنوع در مناطق جغرافیایی نمی‌باشد. در حالی که نتایج بررسی‌های سایر محققین حاکی از این است که جدایه‌های جمع‌آوری شده از هر منطقه جغرافیایی، از نظر ژنتیکی شباهت بیشتری به هم دارند. مثلاً Kosawang et al. (2006) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی *Xoo* در شمال تایلند، ۳۰ جدایه از این باکتری که از مناطق مختلف برنج‌خیز جمع‌آوری شده بودند را با استفاده از AFLP مورد بررسی قرار داده و در مجموع شش دودمان مختلف، منطبق با موقعیت جغرافیایی تشخیص داده شد. همچنین در تحقیق Ochiai et al. (2000) که به منظور تشخیص ساختار ژنتیکی *Xoo* در سری‌لانکا صورت گرفت، ۶۰ جدایه *Xoo* از ۲۹ ناحیه مختلف سری‌لانکا را با استفاده از RFLPی قطعات 16s و 23s rDNA و کاوشگر *IS1112* مورد بررسی قرار دادند. آنالیز بوت‌استراپ نشان داد که جدایه‌های مذکور از نظر روابط خویشاوندی در پنج گروه مختلف قرار گرفتند که هر گروه تقریباً با شرایط آب و هوایی مرتبط بود.Gonzalez et al. (2007) نیز چند شکلی DNA جدایه‌های *Xoo* جمع‌آوری شده از برنج در غرب آفریقا و همچنین تفاوت ژنتیکی این جدایه‌ها با جدایه‌های آسیایی را مورد بررسی قرار دادند .در تحقیق آن‌ها روش‌های RFLP، FAFLP و rep-PCR جهت ارزیابی مولکولی به کار گرفته شدند. نتایج حاصل از FAFLP، جدایه‌های *Xoo* را به سه گروه با بوت‌استراپ قابل قبول تقسیم‌بندی کرد. در تمامی موارد، جدایه‌های آفریقایی *Xoo* از نظر ژنتیکی گروه مجزایی از جدایه‌های آسیایی تولید کردند. یکی از دلایلی که می‌تواند توجیه‌کننده عدم هماهنگی این نتایج با تحقیق حاضر باشد این است که جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از طیف جغرافیایی نسبتاً محدودی (استان گیلان) جمع‌آوری شده بودند. از آنجایی که شرایط اقلیمی استان گیلان در مناطقی که برنج کشت می‌شود، تقریباً یکسان می‌باشد نمی‌توان انتظار داشت که تفاوت در مناطق جمع‌آوری عامل مؤثری در تفاوت ژنتیکی جدایه‌ها باشد و لذا جدایه‌های مختلف بر اساس مناطق جمع‌آوری تفکیک نشدند. در دندروگرام ترسیم شده، حروف N، F و P به ترتیب نشان‌دهنده جدایه‌های جمع‌آوری شده از مرحله خزانه، مزرعه (نمونه‌های برگی) و خوشه می‌باشند. بر این اساس جدایه‌ها در سه گروه (A، B و C) دسته‌بندی شدند. گروه اول (A) شامل ۲۰ جدایه خزانه (جمعیت N)، گروه دوم (B) فقط شامل۲۰ جدایه برگی (جمعیتF) و گروه سوم (C) دارای ۲۰ جدایه و شامل تمامی جدایه‌های جمع‌آوری شده از خوشه (جمعیت P) به همراه تعدادی از جدایه‌های جمعیت‌های N و F بود. همان طور که مشاهده می‌شود جدایه‌ها با توجه به مرحله جداسازی، در گروه‌های نسبتاً مجزایی قرار گرفته‌اند. از آنجایی که تأثیر مرحله جداسازی جدایه‌ها تا حدی بر تفکیک ژنتیکی آن‌ها مؤثر بوده است، سه جمعیت جدایه‌های خزانه، برگی و خوشه مبنا قرار گرفته شدند و سایر تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی توسط نرم‌افزارهای دیگر بر اساس این سه جمعیت انجام شدند.

نتایج بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی

متوسط تعداد هم ردیف[1] مشاهده شده(Na)، تعداد هم‌ردیف‌های مؤثر (Ne)، تنوع ژنی نی[2] و شاخص اطلاعاتی شانون[3] در جدول پنج آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین میزان هم‌ردیف مشاهده شده، هم‌ردیف مؤثر و تنوع ژنی در جمعیت N (جدایه‌های خزانه) و کمترین مقدار آن‌ها در جمعیتP (جدایه‌های خوشه) مشاهده شد.

[1] Allele
[2] Nei's gene diversity
[3] Shannon's Information index

جدول ۵- متوسط تعداد هم‌ردیف مشاهده شده، هم‌ردیف مؤثر، تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعاتی شانون برای جمعیت‌ها

جمعیت	تعداد افراد	Na	Ne	تنوع ژنی نی	شاخص اطلاعاتی شانون
N	۲۵	۱/۹۴ ± ۰/۲۵	۱/۵۷ ± ۰/۳۲	۰/۳۳ ± ۰/۱۵	۰/۴۹ ± ۰/۱۹
F	۲۴	۱/۸۴ ± ۰/۳۶	۱/۵۴ ± ۰/۳۵	۰/۳۱ ± ۰/۱۷	۰/۴۶ ± ۰/۲۴
P	۱۱	۱/۶۶ ± ۰/۴۷	۱/۴۲ ± ۰/۳۹	۰/۲۴ ± ۰/۲۰	۰/۳۶ ± ۰/۲۸
متوسط	-	۱/۸۱ ± ۰/۳۶	۱/۵۱ ± ۰/۳۵	۰/۲۹ ± ۰/۱۷	۰/۵۷ ± ۰/۱۴

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در بین جدایه‌های خزانه (جمعیت N) مشاهده شد زیرا بیشترین میزان تنوع ژنوتیپی (بر مبنای شاخص اطلاعاتی شانون)، درصد جایگاه‌های چند شکل، تعداد هم‌ردیف مؤثر و تنوع ژنی که همگی از شاخص‌های مهم تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها هستند، در این جمعیت برآورد شدند. همچنین کمترین میزان تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص‌های ذکر شده، در بین جدایه‌های خوشه (جمعیت P) مشاهده گردید. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که جدایه‌های خزانه تعدادشان از دو جمعیت دیگر مورد بررسی بیشتر است و از آنجایی که خزانه‌ها زیر پوشش پلاستیکی می‌باشند، شرایط متعادل‌تر و مناسب‌تری برای رشد باکتری‌ها فراهم بوده و هر چه شرایط رشد برای باکتری بهتر باشد و باکتری‌ها با سرعت بیشتری رشد و تکثیر یابند، با توجه به جهش و سایر تغییرات ژنتیکی، تنوع بین آن‌ها نیز افزایش می‌یابد (Arber 2003).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی انجام شده روی سه جمعیت مورد بررسی، در جدول شش آمده است. نتایج بیانگر این است که تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد. واریانس بین افراد درون جمعیت‌ها ۷۳ درصد کل تنوع را توجیه می‌کند در حالی که واریانس بین جمعیت‌ها ۲۷ درصد کل تنوع را تشکیل می‌دهد. این نتیجه Hu et al. (2007) مطابقت دارد. در تحقیق آن‌ها که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ جدایه *Xoo* از نه کشور برنج خیز با استفاده از RFLP قطعات *IS* و RAPD صورت گرفت، بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها بود. یکی از دلایل کم بودن واریانس بین جمعیت‌ها، شرایط آب و هوایی مشابه و تقریباً یکسان مناطق جغرافیایی جمع‌آوری جدایه‌ها می‌باشد. همچنین از دیگر دلایل این امر این است که تعداد جمعیت‌ها کم بوده (سه عدد) و درجه آزادی دو (df =۲)، توجیه کننده واریانس بین جمعیت‌ها، نبوده است. از طرفی برخی جدایه‌ها از مرحله خزانه‌ای تا مرحله خوشه‌دهی، بر روی برنج فعالیت می‌کنند. بنابراین هنگام جداسازی جدایه‌ها در مراحل رشدی مختلف برنج ممکن است جدایه‌هایی جداسازی شوند که در مراحل مختلف رشدی یکسان بوده باشند که این مورد نیز باعث کاهش واریانس بین جمعیتی می‌شود.

نتایج محاسبه فاصله و تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه

تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس روش Nei (1987) با احتساب اریبی و بدون آن محاسبه شد. نتایج در جدول‌های هفت و هشت آمده است.

جدول ۶- مقایسه اجزا و درصد واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌ها

منبع تغییر	Df	SS	MS	اجزای واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت	۲	۴۷۷/۸۶	۲۳۸/۹۳	۱۰/۹۸	۲۷درصد
درون جمعیت	۵۷	۱۷۳۰/۲۱	۳۰/۳۵	۳۰/۳۵	۷۳درصد
کل	۵۹	۲۲۰۸/۰۸	-	۴۱/۳۴	۱۰۰درصد

جدول ۷- تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس شاخص نی با احتساب اریبی

جمعیت	N	F	P
N	-	۰/۷۹۷	۰/۷۹۶
F	۰/۲۲۶	-	۰/۸۳۸
P	۰/۲۲۷	۰/۱۷۶	-

جدول ۸- تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس شاخص نی بدون احتساب اریبی

جمعیت	N	F	P
N	-	۰/۸۰۵	۰/۸۰۶
F	۰/۲۱۶	-	۰/۸۴۸
P	۰/۲۱۴	۰/۱۶۳	-

*اعداد بالای قطر مقادیر تشابه ژنتیکی و اعداد زیر قطر بیانگر میزان تفاوت ژنتیکی می‌باشند.

نتایج ارائه شده در جدول‌های هفت و هشت نشان می‌دهد که بیشترین مقدار فاصله ژنتیکی و نیز کمترین مقدار تشابه ژنتیکی بین جمعیت N با دو جمعیت دیگر مشاهده می‌شود. این امر می‌تواند بیانگر تمایز نسبی جدایه‌های جمعیت N از سایر جدایه‌ها باشد. همچنین جدایه‌های متعلق به جمعیت‌های F و P از نظر تشابه ژنتیکی به هم نزدیک‌ترند. چنین نتیجه‌ای می‌تواند به این دلیل باشد که بسیاری از جدایه‌های مرحله مزرعه‌ای تا زمان خوشه‌دهی روی بوته‌های برنج فعالیت می‌کنند. از طرفی جدایه‌های جمعیت N (خزانه‌ای) در شرایط خاصی از نظر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

رطوبتی و دمایی (معمولاً در دمای پایین‌تر و اغلب زیر پلاستیک) رشد می‌کنند ولی شرایط آب و هوایی در زمان فعالیت و رشد جدایه‌های برگی و خوشه‌ای، تقریباً یکسان می‌باشد. با توجه به اینکه دوری و جدایی جغرافیایی یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تنوع بین جمعیت‌ها است، از آنجایی که جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش از طیف جغرافیایی نسبتاً محدودی (استان گیلان) جداسازی شده بودند، وجود تشابه ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها قابل توجیه می‌باشد. البته تجزیه واریانس مولکولی نیز تأیید کننده این مطلب است زیرا همان طور که در تجزیه واریانس مولکولی مشاهده شد، درصد واریانس درون جمعیت‌ها (تنوع درون جمعیت) خیلی بیشتر از درصد واریانس بین جمعیت‌ها (تنوع بین جمعیت‌ها) بوده است. از آن‌جایی که شرایط آب و هوایی خزانه تا حد زیادی متفاوت از شرایط آب و هوایی است که جدایه‌ها در مزرعه با آن مواجه‌اند، تفاوت ژنتیکی بالا بین جمعیت‌های N و F و نیز تشابه ژنتیکی بالا بین جمعیت‌های F و P که در شرایط آب و هوایی تقریباً یکسانی به سر می‌برند، قابل توجیه بوده و نشان‌دهنده اهمیت شرایط آب و هوایی در تنوع ژنتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت زیاد بیماری بلایت باکتریایی برنج در آسیا، و تنوع ژنتیکی و نژادی بالایی که در باکتری عامل این بیماری وجود دارد، تاکنون کارهای اندکی در مورد تنوع ژنتیکی و نژادی این باکتری در ایران صورت گرفته است. در این تحقیق برای اولین بار از نشانگر RAPD، جهت بررسی تشابه و تفاوت ژنتیکی جدایه‌های باکتریایی خزانه، برگی و خوشه در استان گیلان استفاده گردید. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، سطح بالایی از چند شکلی (پلی‌مورفیسم)، در جمعیت‌های مورد بررسی وجود داشته و مشاهده شد که جدایه‌های خزانه و برگی، گروه‌های مجزایی از نظر ژنتیکی می‌باشند. نتایج حاصل از تجزیه مولکولی و فاصله و شباهت ژنتیکی، نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت N و F وجود داشته و در تجزیه کلاستر نیز دو جمعیت مذکور، در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. همچنین با برش دندروگرام از نقطه ۰/۵۵، دو جمعیت F و P در یک خوشه قرار می‌گیرند که این نیز تأئید کننده نتایج تجزیه مولکولی و شباهت ژنتیکی بیشتر در دو جمعیت مذکور می‌باشد. از طرفی در نتایج حاصل از خوشه‌بندی، گروه سوم (C) حاوی جدایه‌های خوشه به همراه تعدادی از جدایه های برگی و خزانه بود که دلیل این موضوع می‌تواند بعلت عدم توانایی کافی نشانگرهای مورد استفاده جهت تفکیک این جمعیت از جدایه‌های دو جمعیت دیگر (تشابه زیاد این جمعیت با دو جمعیت دیگر) و همچنین به علت کم بودن جمعیت جدایه‌های خوشه باشد. روش RAPD کاربردی وسیع در مطالعات تنوع ژنتیکی دارد. اما با وجود مزایای نسبی این روش، یکی از مهم‌ترین معایب آن این است که با استفاده از این نشانگرها، امکان تمایز بین افراد هتروزیگوس و هموزیگوس وجود ندارد. بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی دیگر مانند AFLP، میکروساتلایت و غیره، جهت تشخیص بهتر تفاوت و تشابه ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی در این تحقیق و تأیید نتایج و تفکیک بهتر این جمعیت‌ها، ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم آزمایشگاه مرکزی و گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان، که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Adhikari TB, Mew TW Leach JE (1999) Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. Phytopathology 89: 687-694.

Arber W (2003) Elements for a theory of molecular evolution. Genetics 317: 3-11.

Ardales EY, Leung H, VeraCruz CM, Mew TW, Leach JE Nelson RJ (1996) Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogene across diverse agro ecosystem in the Philippines. Phytopathology 86: 241-252.

Asemaninejad A (2008) Identification of bacterial pathogens and seed borne feasibility of rice in paddies of Guilan province, Master of Science thesis, University of Guilan (In Farsi).

Fang ZD, Xu ZG, Guo S, Yin S, Wu Z Zhang Q (1990) Studies on pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in China. Acta Phytopathologica Sinica 20: 81-88.

Ferluga S, Bigirimana J, Hofte M Venturi V (2007) A lux R homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]

required for optimal rice virulence. Molecular Plant Pathology 8: 529-538.

Gang L, Cong- Feng S, Xiao- Mia P, Yue Y, Jin-Sheng W (2009) Analysis of pathotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in China. Phytopathology 157: 208- 218.

Ghasemi E (2007) Identification of rice bacterial pathogens in Guilan province nurseries, Master of Science thesis, University of Guilan (In Farsi).

Gonzalez C, Szurek B, Manceau C, Mathieu T, Sere Y, Verdier V (2007) Molecular pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. Molecular Plant-Microbe Interactions 20: 534-546.

Gupta V S, Rajebhosale M D, Sodhi M, Sukhwinder Sight, Gnanamanickam S S, Dhaliwal H S, Ranjekar P K (2001) Assessment of genetic variability of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using RAPD-PCR and *IS1112*-based PCR. Current Science 80: 1043-1049.

Hu J, Zhang Y, Qian W He C (2007) Avirulence gene and insertion element-based RFLP as well as RAPD markers reveal high levels of genomic polymorphism in the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae.* Systematic and Applied Microbiology 30: 587-600.

Jyufuku S, Furuya N, Goto T, Tsuchiya K Yoshimura A (2009) Pathogenic and genetic diversity in Asian strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Faculty of Agriculture, Kyushu University, 54: 19-23.

Khoshkdaman M (2007) Identification of rice bacterial pathogen in Guilan province, Master of Science thesis, University of Guilan (In Farsi).

Kosawang C, Smitamana P, Toojinda T, Nilpanit N Sirithunya P (2006) Amplified fragment length polymorphism fingerprinting differentiates genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from northern Thailand. Phytopathology 154: 550-555

Leach J E, Rhoads M L, Vera Cruz C M, White F F Mew T W (1992) Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. Applied and Environtal Microbiology 58: 2188-2195.

Leung H, Nelson RJ Leach JE (1993) Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. Advances in Plant Pathology 10: 157-205.

Mew TW (1987) Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Annual Review of Phytopathology 25: 359-382.

Mew TW, Alvarez AM, Leach JE Swings J (1993) Focus on bacterial blight of rice. Plant Disease 77: 5-12.

Nei M (1987) Molecular phylogeny and genetic diversity analysis. Pennsylvania State University, University Park PA 16802 USA

Noda T, Yamamoto T, Kaku H Horino O (1996) Geographical distribution of pathogenic races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Japan in 1991 and 1993. Annual Phytopathological Society of Japan 62: 549-553.

Ochiai H, Horiono O, Miyajima K Kaku H (2000) Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. Phytopathology 90: 415-421.

Raina GL, Sidhu GS and Saini PK (1982) Rice bacterial blight status in Punjab India. Review of Plant Pathology 61: 49-62.

Sukhwinder S, Sodhi M, Vikal Y, George M, Bala G, Mangat G, Garg M, Sidhu J and Dhaliwal H (2003) DNA fingerprinting and virulence analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from Punjab northern India. Euphytica 130: 107-115.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.2.11.8]