

تفکیک ژنتیکی جدایه‌های باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

عامل پوسیدگی غلاف و قهوه‌ای شدن پوسته شلتوک در مراحل

مختلف رشد از استان گیلان با استفاده از نشانگرهای RAPD

سمیه داریوش^{۱*}، مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور^۱، سید علی الهی‌نیا^۱، علی‌اکبر عبادی^۲ و بابک ربیعی^۲

۱- گروه بیماری‌شناسی، دانشگاه گیلان

۲- آزمایشگاه بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور

۳- گروه زراعت، دانشگاه گیلان

* dariush_rona@yahoo.com

چکیده

باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) در برنج بیماری‌زا بوده و باعث پوسیدگی غلاف و سوختگی بذر برنج می‌شود. بیماری ایجاد شده توسط باکتری می‌تواند عملکرد محصول و کیفیت بذر را کاهش دهد. در این بررسی سی و هشت جدایه این باکتری که طی سال‌های ۱۳۸۶ - ۱۳۸۴ از مزارع برنج استان گیلان نمونه‌برداری و شناسایی شده بودند، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این تحقیق سه جمعیت شامل جدایه‌های جمع‌آوری شده از اندام‌های رویشی برنج در مزرعه، خوشه و خزانه و همچنین یک جدایه مرجع (CFBP 2535) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* به‌عنوان خارج از گروه (out group) مدنظر قرار داده شدند. جدایه‌های *Pss* از ارقام علی کاظمی، هاشمی و خزر حدسازی شدند. ده آغازگر به کار برده شده در مجموع ۲۱۰ نوار چند شکل ایجاد کردند (۹۹/۵٪). بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر ۷۰/۹ و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر OPA-12 (۰/۱۹) بود. تجزیه واریانس مولکولی داده‌های RAPD نشان داد که تفاوت ژنتیکی درون جمعیتی بیشتر از تفاوت بین جمعیت‌ها است. با تجزیه ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی مشخص شد که بیشترین تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های خوشه و خزانه و کمترین تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های مزرعه و خزانه بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام شد. در سطح تشابه ۰/۲۲ جدایه‌ها در ۲ گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه *Xa. ar. pv. pruni* به طور جداگانه در یک گروه و تمامی جدایه‌های *Pss* در گروه دیگر قرار گرفتند. در سطح تشابه ۰/۳۴ جدایه‌های *Pss* در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های مزرعه، گروه دوم شامل نیمی از جدایه‌های خوشه و گروه سوم در سطح تشابه ۰/۴۸ از دو زیر گروه، جدایه‌های خوشه و جدایه‌های خزانه تشکیل شد. نتایج نشان داد که

نشانهگر RAPD قادر به تفکیک جدایه‌ها از یکدیگر در مراحل مزرعه، خوشه و خزانه می‌باشد.

کلمات کلیدی: برنج، نوع ژنتیکی، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و RAPD

مقدمه

برنج از محصولات زراعی قدیمی است که مبدأ پیدایش آن آسیای جنوب شرقی می‌باشد (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۶). این گیاه پس از گندم از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید و اهمیت غذایی در رتبه دوم قرار دارد و به همراه گندم و ذرت تأمین کننده بیش از ۵۰ درصد کالری مورد نیاز بشر می‌باشد (ردی و بومن، ۱۹۸۶). طبق آمار به دست آمده از سازمان خواربار کشاورزی (FAO)، سطح زیر کشت برنج در جهان در سال ۲۰۰۸ برابر با ۱۵۵۷۱۱۰۰۰ هکتار می‌باشد که کشور ایران با داشتن مساحت زیر کشت ۶۳۰۰۰۰ هکتار و تولید سالانه ۳۵۰۰۰۰۰ تن در رتبه بیست و دوم قرار دارد. از نظر سطح زیر کشت برنج استان گیلان با سطح کشتی معادل ۱۸۱۶۹۴ هکتار بعد از استان مازندران در رتبه دوم قرار دارد. در حال حاضر هر ساله حدود ۳۴ درصد از محصولات گیاهی در اثر بیماری، آفات و علف‌های هرز از بین می‌روند، که از این مقدار ۲۳ درصد خسارت ناشی از عوامل بیماری‌زا می‌باشد (نیک نژاد و اکبری، ۱۳۸۱). بیماری‌های برنج در غالب مناطق کشت این گیاه عامل اصلی کاهش محصول هستند (بوستر و گانل، ۱۹۹۲). باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* موجب بیماری پوسیدگی باکتریایی و سوختگی بذر برنج می‌شود (او، ۱۹۸۵). این بیماری می‌تواند عملکرد محصول و کیفیت بذر را کاهش دهد (صحراگرد و خداپرست، ۱۳۸۳). قاسمی (۱۳۸۵) و آسمانی نژاد (۱۳۸۶) به ترتیب بیماری‌زایی *Pss* را برای اولین بار در خزانه و همچنین روی خوشه برنج در مزارع استان گیلان گزارش کردند، همچنین خشکدامن و همکاران (۲۰۰۸) برای اولین بار پوسیدگی غلاف برنج ناشی از این باکتری را از استان گیلان گزارش نمودند. از نشاگرهای مولکولی مختلفی تاکنون برای تعیین خصوصیت و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *Pss* استفاده شده است که شامل تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (RFLP) (اسکولز و همکاران، ۱۹۹۴)، DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) (کلرک و همکاران، ۱۹۹۸)، PCR عناصر تکرارشونده (rep-PCR) (اسکورتهجینی و همکاران، ۲۰۰۳) و تفاوت طول قطعه های حاصل از تکثیر (AFLP) (کلرک و همکاران، ۱۹۹۸؛ سیرویلری و همکاران، ۲۰۰۶) می‌باشد. *P. syringae* یک گونه هتروژن بوده (یکنولد و گروکن، ۱۹۷۳)، که ۱۸۰ گونه گیاهی تک لپه و دو لپه را آلوده می‌سازد (راموس و همکاران، ۲۰۰۷) و به بیش از ۵۰ پاتوار تقسیم شده است (گاتمن و همکاران، ۲۰۰۸). *P. s.* pv. *syringae* یکی از پاتوارهای این گونه است، که عامل بیماری‌زا در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی می‌باشد (یانگ، ۱۹۹۱). تست‌های بیوشیمیایی قادر به تشخیص تفاوت در سطح زیر گونه نیستند (هیلدبراند و همکاران، ۱۹۸۲)، در نتیجه از نشاگرهای مولکولی برای بررسی تنوع در سطح زیر گونه استفاده می‌شود.

تفکیک ژنتیکی جدایه‌های باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* .../داریوش و همکاران

با بررسی تنوع ژنتیکی عوامل مؤثر بر تنوع گونه‌ای عامل بیماری‌زا و اثر تنوع میزبان روی تنوع ژنتیکی برآورد می‌شود و درک بهتری از ساختار جمعیتی و ژنتیکی پاتوژن، به دست می‌آید (لاوس و همکاران، ۱۹۹۹). منعاقباً این قبیل یافته‌ها در قرنطینه گیاهی، استفاده از منبع مقاومت، برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک حائز اهمیت هستند (کاکو، ۲۰۰۳)، که به توسعه راهکارهای مدیریت پایدار بیماری‌های باکتریایی کمک می‌کند (لاس و همکاران، ۱۹۹۹). نشانگر RAPD (ویلیامز و همکاران، ۱۹۹۰) به عنوان روش کارآمد برای مطالعه تنوع ژنتیکی باکتری‌ها در سطح زیر گونه می‌باشد (میشلی و همکاران، ۱۹۹۴؛ لی و همکاران، ۲۰۰۵ و اونگاجویی و همکاران، ۲۰۰۷) و به عنوان یک روش مناسب بدون نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA در طراحی پرایمر برای بیان تنوع و تشابه در ارگانسیم‌های مختلف استفاده می‌شود (یون و کیم، ۲۰۰۱). نشانگر RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتریایی از قبیل *Xanthomonas cynarae* (تربائول و همکاران، ۲۰۰۱)، *Xanthomonas axonopodis* pv. *diffrinbachia* (کودو و فاکیم، ۲۰۰۴) و *P. s. pv. syringae* (خیامی و همکاران، ۲۰۰۹) به کار می‌رود. هدف از این پژوهش تفکیک ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ارقام مختلف برنج در طول رشد رویشی گیاه در مراحل مزرعه، خوشه و خزانه نواحی مختلف استان گیلان با استفاده از نشانگرهای RAPD بوده است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری، خالص‌سازی و نگهداری آن‌ها

سی و هشت جدایه *Pss* در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند که طی سال‌های ۱۳۸۶ - ۱۳۸۴ از مزارع برنج استان گیلان در خزانه، برگ آلوده در مزرعه و خوشه جداسازی و شناسایی شده بودند (قاسمی، ۱۳۸۵؛ خشکدامن و همکاران، ۲۰۰۸ و آسمانی نژاد، ۱۳۸۶). این جدایه‌ها از ارقام علی‌کاظمی، هاشمی و خزر جداسازی شده بودند. یک جدایه مرجع *Xanthomonas* (CFBP 2535) *arbicola* pv. *pruni* به عنوان خارج از گروه^۱ در نظر گرفته شد. فهرست کامل جدایه‌های به کار گرفته در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها، سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری (غلظت تقریبی 1×10^8 cfu) روی سطح تشتک پتری حاوی آگار مغذی (NA) توسط لوپ سترون به صورت مخطط کشت گردید. سپس تشتک پتری‌ها در انکوباتر تحت دمای 27°C - ۲۵ قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت تک پرگنه‌های مناسب انتخاب شدند و مجدداً در تشتک پتری حاوی NA کشت شده، و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 27°C - ۲۵ نگه‌داری شدند. بعد از رشد پرگنه‌های باکتری، کلیه جدایه‌ها به روش یساده و همکاران (۱۹۹۲) در محیط LP (۷g/Lit) عصاره

مخمرهای Ygr/Lit باکتو پیتون و ۳۰٪ گلیسرول) در لوله های ۱/۵ ml کشت داده شد، و در فریزر در دمای °C ۷۰- نگه داری شدند

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته باکتری مذکور در سطح محیط NA استفاده گردید. استخراج DNA به روش ستیل تری آمونیوم بروماید یا CTAB که توسط آزوبل و همکاران (نقل از کلرک و همکاران، ۱۹۹۸) ارائه شده بود، انجام پذیرفت. نمونه های DNA روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شدند و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داگ تحت نور UV با طول موج ۳۱۲ nm (بررسی کیفیت DNA استخراج شده) مشاهده شدند. غلظت DNA استخراج شده نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل 530[®] DU ساخت شرکت BEKMAN COULTER™ تخمین زده شد.

واکنش RAPD

واکنش RAPD با ۱۰ آغازگر انجام شد، اسامی و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. واکنش در حجم نهایی ۲۵µl انجام شد که حاوی ۵۰ ngr DNA ژنومی، mM ۰/۴ از هر آغازگر، ۲ U Taq DNA polymerase و mM ۰/۴ از dNTP بود. PCR در دستگاه ترمو سایکلر مدل my Genie ساخت شرکت BIO NEER انجام شد. چرخه حرارتی PCR به صورت مقابل بود: ۵ دقیقه در °C ۹۴، ۴۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در °C ۹۴، ۱ دقیقه در °C ۳۶ و ۱ دقیقه در °C ۷۲ و بسط نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. پس از تکثیر، الکتروفورز محصول در ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت انجام شد. برای مشاهده باندها، ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و در دستگاه ژل داگ تحت نور UV با طول موج ۳۱۲ nm قرار داده شد. جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی، در یکی از لوله ها تمام مواد واکنش به غیر از DNA الگو ریخته شدند و در کنار سایر نمونه ها و با شرایط یکسان، واکنش PCR انجام شد. الگوی نواریندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه های Pss توسط آغازگر ۷۰/۹ در تصویر ۱ آمده است.

تجزیه خوشه ای

امتیازدهی باندهای موجود در هر ژل بر مبنای صفر و یک انجام شد. به این ترتیب که در هر نمونه در صورت حضور یک باند امتیاز ۱ و در صورت عدم حضور آن امتیاز ۰ داده شد. ۳۸ جدایه باکتری بر مبنای محل جداسازی به ۳ جمعیت مجزا مزرعه (۱۱ جدایه)، خوشه (۱۵ جدایه) و خزانه (۱۲ جدایه) تفکیک شدند. به منظور ارزیابی و تجزیه و تحلیل داده های حاصل از نشانگرهای RAPD در تفکیک ژنتیکی جمعیت ها از سه نرم افزار NTSYS-pc، POPGENE و Genealex استفاده شد.

نتایج و بحث

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق دارای نتایج قابل تفسیر بودند. محتوی G+C این آغازگرها بیشتر از ۶۰٪ بود، در حالی که محتوی G+C ژنوم *P. syringae* حدود ۵۹-۶۰٪ است (کلرک و همکاران، ۱۹۹۸). ده آغازگر به کار رفته در مجموع ۲۱۰ نوار چند شکل ایجاد کردند (۹۹/۵٪). بیشترین و کمترین نوار به ترتیب به آغازگرهای OPA-10 (۲۸ باند) و G13 (۱۷ باند) اختصاص داشت. میانگین باند برای هر آغازگر ۱۲/۹ بود. بیشترین و کمترین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای ۷۰/۹ (۰/۴۲) و OPA-12 (۰/۱۹) و بیشترین و کمترین تنوع ژنی نی (H) به ترتیب مربوط به آغازگرهای ۷۰/۹ (۰/۴۱) و G13 (۰/۲) بود (جدول ۲). بر اساس محتوای اطلاعات چند شکلی و تنوع ژنی نی، مفیدترین و مؤثرترین آغازگر ۷۰/۹ بود. بر اساس نتایج به دست آمده از عوامل مؤثر در تنوع ژنتیکی درون جمعیت (میزان تنوع ژنوتیپ (I)، در صد جایگاه‌های چند شکل (P)، تعداد ال مؤثر (Ne) و تنوع ژنی نی (H)) بیشترین تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در بین جدایه‌های مزرعه (PRF) و کمترین آن در بین جدایه‌های خزانه (PRN) دیده شد. بیشتر بودن میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در بین جدایه‌های مزرعه را می‌توان به متنوع بودن زمان نمونه برداری برای جداسازی باکتری در مزرعه نسبت داد (نمونه برداری در ۳ مرحله، ۱۰ روز بعد از نشا در مزرعه، مرحله پنجم زنی و مرحله شکم بوت‌ها انجام شد). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی تنوع بیشتری در بین افراد درون جمعیت دیده شد، و میزان این تنوع در بین افراد بین جمعیت کمتر بود. علت آن را می‌توان به متنوع بودن مناطق جغرافیایی جمع آوری جدایه‌ها در مراحل مختلف رشد گیاه برنج و بیشتر بودن تعداد جدایه‌های مورد بررسی در یک جمعیت نسبت داد، از طرفی جدایه‌های *Pss* به صورت اپیفیت از مرحله خزانه تا زمان خوشه دهی روی برنج فعالیت می‌کنند، بنابراین هنگام جداسازی جدایه‌ها در مراحل مختلف رشدی برنج ممکن است جدایه‌هایی که در مرحله رشدی یکسان قرار دارند، جداسازی شوند در نتیجه واریانس بین جمعیتی کاهش می‌یابد. بر اساس شاخص نی بیشترین تشابه ژنتیکی بین جدایه‌های خوشه و خزانه و کمترین آن بین جدایه‌های مزرعه و خزانه بود. تشابه ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌ها مشاهده شد. وجود تشابه ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها را می‌توان به دو عامل محدود بودن منطقه جغرافیایی (مزارع مختلف استان گیلان) و اختصاص یافتگی میزبان در جدایه‌های *Pss* نسبت داد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام شد. در سطح تشابه ۰/۲۲ جدایه‌ها در ۲ گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه *Xa. ar. pruni* pv. به طور جداگانه در یک گروه و تمامی جدایه‌های *Pss* در گروه دیگر قرار گرفتند. در سطح تشابه ۰/۳۴ جدایه‌های *Pss* در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های مزرعه، گروه دوم شامل نیمی از جدایه‌های خوشه می‌باشد، و گروه سوم در سطح تشابه ۰/۴۸ از دو زیر گروه،

جدایه‌های خوشه و جدایه‌های خزانه تشکیل شده است (تصویر ۲). نتایج حاصل از تجزیه کلاستر به نوعی نتایج به دست آمده از فواصل و تشابهات ژنتیکی و تجزیه مولکولی جمعیت‌ها را تأیید می‌کند. در این بررسی جدایه‌های *Pss* از ارقام مختلف برنج (علی کاظمی، هاشمی و خزر) جداسازی شدند، اما نتایج نشان می‌دهند، ارتباطی بین تنوع رقم میزبان و پاتوزن وجود ندارد. نشانگر RAPD در این پژوهش توانسته جدایه‌های مزرعه و در سطح بالاتر جدایه‌های خوشه را از جدایه‌های خزانه متمایز کند. بر اساس نتایج به دست آمده از دندروگرام می‌توان دریافت که آغازگر RAPD قادر به تمایز جدایه‌های مزرعه از جدایه‌های خزانه می‌باشد که این تمایز با توجه به بیشترین فاصله ژنتیکی بین این دو جمعیت امر بدیهی است. از طرف دیگر جدایه‌های خوشه در دو گروه قرار گرفتند، یک گروه که در سطح تشابه ۰/۳۴ از جدایه‌های مزرعه و گروه دوم که در سطح تشابه ۰/۴۸ از جدایه‌های خزانه تفکیک گردید، شاید علت این امر عدم توانایی کافی آغازگرهای مورد استفاده جهت تفکیک جدایه‌های خوشه از جدایه‌های خزانه، تشابه زیاد این جمعیت با جمعیت خزانه و یا حضور باکتری در سطح برنج از مرحله خزانه تا خوشه دهی باشد. سیرویلری و همکاران (۲۰۰۶) از نشانگر AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pss* از درختان میوه هسته دار استفاده کردند، نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جدایه‌های *Pss* وجود دارد، که شامل جدایه‌های جدا شده از یک میزبان هم می‌شود، از طرفی این نشانگر نتوانست جدایه‌ها را بر حسب میزبان تفکیک کند. به طور کلی می‌توان گفت که نشانگرهای RAPD عملکرد خوبی در تفکیک جدایه‌های مزرعه، خوشه و خزانه داشته، و زمینه را برای مطالعه تعامل بین پاتوزن و گیاه فراهم آورده، که می‌توان از آن در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به جدایه‌های *Pss* و اتخاذ روش کنترلی مناسب‌تر علیه عامل بیماری‌زا استفاده نمود.

پیشنهادات

- ۱- با توجه به اینکه جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش از طیف جغرافیایی باریکی جداسازی شده‌اند، پیشنهاد می‌شود برای دستیابی به اطلاعات دقیق‌تر در مورد تنوع ژنتیکی جدایه‌های این باکتری، جدایه‌ها از مناطق وسیع‌تری جمع‌آوری شوند و تنوع آن‌ها با نشانگر RAPD مورد مطالعه قرار گیرد.
- ۲- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های موردنظر به همراه تعداد بیشتری از جدایه‌ها و نشانگرهای RAPD
- ۳- بررسی عوامل مؤثر بر ساختار ژنتیکی جدایه‌های *Pss* در مزارع برنج استان گیلان
- ۴- تعیین نژاد جدایه‌های *Pss* از مزارع برنج استان گیلان
- ۵- بررسی وجود *Pss* در علف‌های هرز اطراف مزارع برنج و مطالعه تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها در علف‌های هرز و سایر گیاهان

منابع

۱. آسمانی نژاد حسن کیاده، الف. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای خوشه برنج در مزارع استان گیلان و بررسی امکان بذرزاد بودن آن‌ها. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه گیلان. ۹۶ صفحه.
۲. اخوت، س. م. و د. و کیلی. ۱۳۷۶. برنج، کاشت، داشت و برداشت. انتشارات فارابی. ۲۱۲ صفحه.
۳. صحراگرد، الف. و الف. خدایپریت. ۱۳۸۳. بیماری‌های برنج (ترجمه). مرکز نشر دانشگاهی تهران. صفحه ۱۵ - ۳۶.
۴. قاسمی، الف. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای برنج در خزانه های برنج استان گیلان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه گیلان. ۱۱۴ صفحه.
۵. نیک نژاد کاظم پور، م. و س. ل. اکبری. ۱۳۸۱. مدیریت بیماری‌های گیاهی. نشر علوم کشاورزی. ۲۸۰ صفحه.
6. Anonymos. 2008. [http:// www. FAO.org](http://www.FAO.org).
7. Anonymos. 2010. <http://www.maj.ir/portal/Home/Default.aspx>
8. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, O. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., NewYork. 346- 348.
9. Cirvilleri, G., G. Scuderi, A. Bonaccorsi and M. Scortichini. 2006. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from different host plants using fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Plant Pathology*. 88(3): 329-333.
10. Clerc, A., C. Manceau and X. Nesme. 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 1180-1187.
11. Guttman, D. S., R. L. Morgan and P. W. Wang. 2008. The evolution of the *Pseudomonas*. (Eds.). In: Fatmi, M. B., A. Collmer, N. S. Iacobellis, J. W. Mansfield, J. Murillo, N. W. Schaad and M. P. Ullrich. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogen – identification, epidemiology and genomics. *Springer Science*. P. 307-309.
12. Hildebrand, D. C., M. N. Schorth and O. C. Huisman. 1982. The DNA homology matrix and non-random variation concepts as the basic for the taxonomic treatment of plant pathogenic and other bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 20: 235-256.
13. -Kaku, h. 2003. Genetic diversity and in infection mechanism of plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*. 69: 412-414.

14. Khayamie, S., M. Niknejad Kazempour, B. Rabie, S. Sassanie and A. A. Ebadi. 2009. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from ston fruits based on RAPD analysis in Iran. *Agriculture Tropica Et Subtropica*. 42(2): 162-166.
15. Khoodoo, M. H. R. and Y. Jaufeerally-fakim. 2004. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *diffenbachiae* strains isolated from different aroid host and locations. *Plant Disease*. 88: 890-988.
16. Khoshkdaman, M., M. Niknejad Kazempour, A. A. Ebadi, S. Mossanejad and H. Pedramfar. 2008. Identification of causal agent of foot and sheat rot of rice in the fields of Guilan province of Iran. *Agriculture Tropica Et Subtropica* 41(1): 17-20.
17. Lee, J. H., J. H. Kim, J. S. Jung, J. S. Hur and Y. J. Koh. 2005. Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* causing bacterial caker of kiwifruit. *Plant Pathology*. J. 2: 119-126.
18. Louws, F. J., J. L. W. Rademaker and F. J. deBruijn. 1999. The three ds of PCR- base genomic analysis of phytopathogenic bacteria: diversity, detection and disease diagnostic. *Annual Review of Phytopathology*. 37: 81-125.
19. Micheli, M. R., R. Bova, E. Pascale and E. D'Ambrosio. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*. 22: 1921-1922.
20. Ongunjobi, A. A., A. G. O. Dixon and O. E. Fagade. 2007. Molecular genetic study of cassava bacterial blight causal agent in Nigeria using random amplified polymorphic DNA. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 6: 2364-2376.
21. Ou, S. H. 1985. Rice diseases. Kew, Surrey: Common Wealth Agric. Bureau.
22. Pecknold, P. C. and R. G. Grogan. 1973. Deoxyribonucleic and homology groups among phytopathogenic *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic and Bacterial*. 23: 111-121.
23. Ramos, A. R., j. E. Morello, S. Ravindran, W. Deny, H. Hung and A. Collmer. 2007. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can traveled the type III pathway and contribute to the traslocation of effector proteins into plant cells. *Journal of Bacteriology*. 186: 5773-5778.
24. Reddy, A. P. K. and J. M. Bonman. 1987. Recent epidemics of rice blast in india and Egypt. *Plant Dis*. 71-850.
25. Scolz, B.K., J.L. Jakobek and P.B. Lindgren. 1994. Resteriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1093-1100.

26. Scortichini, M., U. Marchisi, M. T. Dettori and M. p. Rossi. 2003. Genetic diversity, presence of the *syrB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plant. *Plant Pathology*. 58(2): 227-286.
27. Trebaul, G., C. Manceau, Y. Tirilly and S. Boury. 2001. Assessment of the genetic diversity among strains of *Xanthomonas cynarae* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and development an specific characterized amplified region for the rapid identification of *X. cynarae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8): 3379-3388.
28. Webster, P. K. and P. S. Ganell. 1992. Compendium of rice diseases. The American Phytopathological Society (APS). St. Paul, Minnesota.
29. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
30. Yessad, S., C. Manceau and J. Luisetti. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* on pear. *Plant Disease*. 76(4): 370-373.
31. Yoon, J. M. and G. W. Kim. 2001. Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. *Indian Academic of Sciences*. 26: 641-647.
32. Young, J. M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902. *Annals of Applied Biology*. 118: 283-289.

جدول ۱- جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق با ذکر نام جدایه، مکان جداسازی، محل جمع‌آوری و رقم میزبان

جدایه باکتری	مکان	محل جمع	رقم میزبان	جدایه باکتری	مکان	محل جمع	رقم میزبان
	جداسازی	آوری		جداسازی	آوری		
PRF1	مزرعه	رشت	علی کاظمی	PRP9	خوشه	لاهیجان	علی کاظمی
PRF2	مزرعه	رشت	علی کاظمی	PRP10	خوشه	رشت	علی کاظمی
PRF3	مزرعه	لاهیجان	علی کاظمی	PRP11	خوشه	رشت	خزر
PRF4	مزرعه	رودسر	علی کاظمی	PRP12	خوشه	حسن رود	خزر
PRF5	مزرعه	آستانه	علی کاظمی	PRP13	خوشه	حسن رود	خزر
PRF6	مزرعه	آستانه	هاشمی	PRP14	خوشه	انزلی	هاشمی
PRF7	مزرعه	کلاچای	هاشمی	PRP15	خوشه	انزلی	هاشمی
PRF8	مزرعه	کلاچای	خزر	PRN1	خرانه	رشت	هاشمی
PRF9	مزرعه	کوچصفهان	خزر	PRN2	خرانه	رشت	هاشمی
PRF10	مزرعه	کوچصفهان	خزر	PRN3	خرانه	لاهیجان	هاشمی
PRF11	مزرعه	کلاچای	خزر	PRN4	خرانه	رودسر	هاشمی
PRP1	خوشه	آستانه	هاشمی	PRN5	خرانه	آستانه	هاشمی
PRP2	خوشه	آستانه	خزر	PRN6	خرانه	آستانه	علی کاظمی
PRP3	خوشه	آستانه	خزر	PRN7	خرانه	کلاچای	علی کاظمی
PRP4	خوشه	بندر کیاشهر	خزر	PRN8	خرانه	کلاچای	علی کاظمی
PRP5	خوشه	بندر کیاشهر	خزر	PRN9	خرانه	کوچصفهان	علی کاظمی
PRP6	خوشه	بندر کیاشهر	علی کاظمی	PRN10	خرانه	کوچصفهان	علی کاظمی
PRP7	خوشه	بندر کیاشهر	علی کاظمی	PRN11	خرانه	کلاچای	خزر
PRP8	خوشه	لاهیجان	علی کاظمی	PRN12	خرانه	کلاچای	خزر
CFBP2535		فرانسه	آلو				

تفکیک ژنتیکی مدایه‌های باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* .../داریوش و همکاران

جدول ۲- نام، توالی نوکلئوتیدی، تعداد نوارهای تشکیل شده، تنوع ژنی نی (H) و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) محاسبه شده برای هر آغازگر در بین جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	تعداد نوارهای تشکیل شده	تنوع ژنی نی (H)	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)
۷۰/۸	5'CTGTACCCCC3'	۱۹	۰/۲۹	۲۱/۰
۷۰/۹	5'TGCAGCACCG3'	۲۱	۰/۴۱	۴۲/۰
۸۰/۷	5'GCACGCCGGA3'	۲۴	۰/۳۴	۳۲/۰
۸۰/۸	5'CGCCCTCCAG3'	۲۴	۰/۳۶	۳۷/۰
H3	5'AGACGTCCAC3'	۲۵	۰/۲۸	۲۶/۰
H13	5'GACGCCACAC3'	۱۹	۰/۲۵	۲۱/۰
G13	5'CTCTCCGCCA3'	۱۷	۰/۲۰	۲۰/۰
OPA-10	5'GTGATCGCAG3'	۲۸	۰/۲۸	۲۸/۰
OPA-11	5'CAATCGCCGT3'	۲۳	۰/۳۵	۳۲۰/۱
OPA-12	5'TGGCCCTCAC3'	۱۹	۰/۲۶	۰/۱۹

جدول ۳- مقادیر تعداد الی مشاهده شده (Na)، تعداد الی مؤثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H)، تنوع ژنوتیپی (I) و درصد جایگاه های چند شکلی (P) برای ۳ جمعیت مزرعه (PRF)، خوشه (PRF) و خزانه (PRN)

جمعیت	تعداد افراد	(Na) تعداد الی مشاهده شده	(Ne) تعداد الی مؤثر	(H) تنوع ژنی نی	(I) تنوع ژنوتیپی	درصد جایگاه های چند شکلی (P)
PRF	۱۱	۱/۷۲۶۴±۰/۴۴۶۹	۱/۴۶۱۹±۰/۳۸۰۰	۰/۲۶۶۳±۰/۱۹۵۰	۰/۳۹۵۶±۰/۲۷۲۶	۷۲/۶۴٪
PRP	۱۵	۱/۶۹۶۵±۰/۴۶۰۹	۱/۴۰۶۴±۰/۳۷۷۲	۰/۲۳۷۸±۰/۱۹۵۱	۰/۳۵۷۷±۰/۲۷۳۵	۶۹/۶۵٪
PRN	۱۲	۱/۴۰۸۰±۰/۴۹۲۷	۱/۲۱۶۵±۰/۳۱۸۶	۰/۱۳۲۱±۰/۱۷۸۵	۰/۲۰۲۱±۰/۲۶۱۷	۴۰/۸۰٪

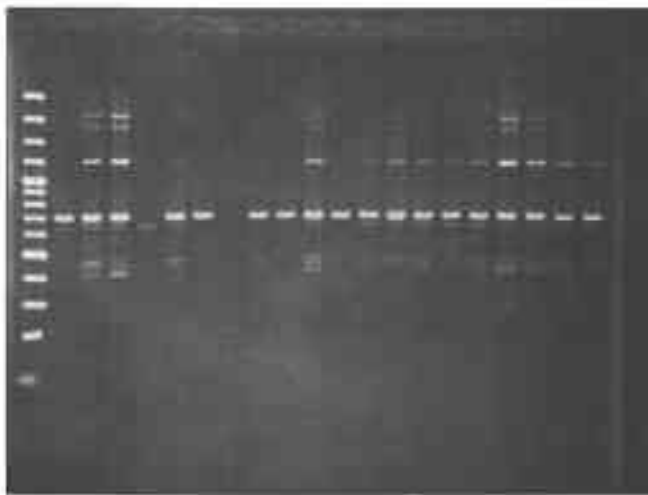
جدول ۴- نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌ها (ANOVA)

منبع تغییر	df	SS	MS	اجزای واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت	۲	۳۶۰/۸۵۷	۱۸۰/۴۲۹	۱۲/۵۱۶	۳۵٪
درون جمعیت	۳۵	۸۱۵/۹۹۵	۲۳/۳۱۴	۲۳/۳۱۴	۶۵٪
کل	۳۷	۱۱۷۶/۸۵۲		۳۵/۸۳۱	۱۰۰٪

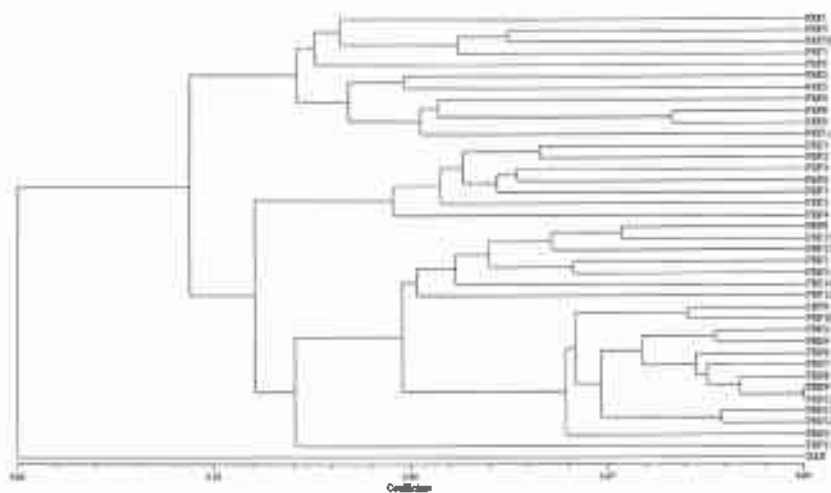
جدول ۵- تشابه و فاصله ۳ جمعیت مزرعه (PRF)، خوشه (PRF) و خزانه (PRN) بر اساس شاخص نی

جمعیت	PRF	PRP	PRN
PRF	***	-۰/۸۱۶۵	-۰/۷۲۹۱
PRP	-۰/۲۰۲۸	***	-۰/۸۸۵۲
PRN	-۰/۳۱۶۰	-۰/۱۲۲۰	***

M ۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸ ۱۹ ۲۰



تصویر ۱- الگوی نواریندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* توسط آغازگر M. ۷۰/۹ (نشانگر اندازه) ۱، (PRP1) ۲، (PRP2) ۳، (PRP3) ۴، (PRP4) ۵، (PRP5) ۶، (PRP6) ۷، (شاهد آب مقطر)، ۸، (PRP7) ۹، (PRP8) ۱۰، (PRP9) ۱۱، (PRP10) ۱۲، (PRP11) ۱۳، (PRP12) ۱۴، (PRP14) ۱۵، (PRP15) ۱۶، (PRN1) ۱۷، (PRN2) ۱۸، (PRN3) ۱۹، (PRN4) ۲۰، (PRN5)



تصویر ۲- دندروگرام رسم شده با استفاده از ضریب تشابه جاکارد